

## 植物铜锌-超氧化物歧化酶(Cu<sup>2+</sup>-Zn<sup>2+</sup>-SOD)测定试剂盒

比色法: 100 管/48 样

### 一、测定原理:

通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基 ( $O_2^- \cdot$ )，后者氧化羟胺形成亚硝酸盐，在显色剂的作用下呈现紫红色，用可见光分光光度计测其吸光度。当被测样品中含 SOD 时，则对超氧阴离子自由基有专一性的抑制作用，使形成的亚硝酸盐减少，比色时测定管的吸光度值低于对照管的吸光度值，通过公式计算可求出被测样品中的 SOD 活力。

植物体中 SOD 可分为 3 种类型：即铜锌-SOD (CuZn-SOD)、锰-SOD (Mn-SOD) 和铁-SOD (Fe-SOD)。高等植物以 Fe-SOD 和 Mn-SOD 为主，高等植物以 CuZn-SOD 为主， CuZn-SOD 主要位于细胞质和叶绿体中，Mn-SOD 主要位于线粒体中，Fe-SOD 一般位于一些植物的叶绿体中。三者相加等于总 SOD (T-SOD)。经样本前处理过的样本中 Mn-SOD 和 Fe-SOD 活力丧失，但 CuZn-SOD 活力不变。

### 二、试剂组成与配制：

试剂编号	试剂名称	装量规格	保存条件
试剂一	缓冲贮备液	10ml×1 瓶	4℃保存 1 年
		(天冷时或放冰箱会有部分结晶析出，需热水浴溶解后再用)	
试剂一应用液的配制：用时每瓶加双蒸水稀释至 100ml，4℃保存 1 年			
试剂二	底物液	10ml×1 瓶	4℃保存 1 年
试剂三	基质液	10ml×1 瓶	4℃保存 1 年
试剂四	酶贮备液	350 μl×2 支	-20℃保存
	酶稀释液	10ml×1 瓶	4℃保存 1 年
酶应用液的配制：用时按酶贮备液：酶稀释液=1：14 的比例进行配制，需多少配多少。配好的酶应用液 4℃保存。			

试剂五	粉剂×1 支	4℃保存 1 年		
	试剂六的配制: 用时加双蒸水 75ml 溶解后备用, 配好后 4℃冷藏避光保存 6 个月			
显色剂	显色应用液的配制: 按试剂五: 试剂六:冰乙酸=3:3:2 的比例进行配制, 4℃避光冷藏 3 个月。[注]: 冰乙酸, 分析纯级, 乙酸浓度≥99.5%			
试剂七	CuZn-SOD 提取甲液	12ml×1 瓶	4℃避光密封保存 1 年	
	CuZn-SOD 提取乙液	12ml×1 瓶	4℃避光密封保存 1 年	
试剂八	匀浆介质	60ml×2 瓶	4℃避光保存 1 年	

#### 四、操作步骤:

**1、20%植物组织匀浆液的制备:** 准确称取植物组织 (0.2~0.5g), 按重量 (g) :体积 (ml) =1:4 的比例, 加入 4 倍体积的匀浆介质, 剪碎, 冰水浴条件下进行匀浆, 制备成 20%的匀浆液, 3500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液待测。

#### 2、T-SOD 最佳取样量的摸索

吸取 20%匀浆上清液 0.1ml, 加入匀浆介质 0.2ml (稀释倍数为 3 倍), 混匀, 分别取 10 μl、30 μl、50 μl 按操作表进行预试验, 以确定最佳取样量。

$$\text{对照 OD 值} - \text{总 SOD 测定 OD 值} \times 100\%$$

百分抑制率计算公式: 抑制率 (%) =  $\frac{\text{对照 OD 值} - \text{总 SOD 测定 OD 值}}{\text{对照 OD 值}} \times 100\%$

最佳取样范围: 百分抑制率在 15~55%之间基本呈正比曲线关系。取百分抑制率在 45%~50%的某一段取样量作为最佳取样量。

最佳取样量的调整: 若百分抑制率大于 60%时 (曲线的平坦部分), 则需将样品浓度稀释或减少取样量后再测试。若百分抑制率小于 20%时, 则需将样品量加大后测试。

**[注]:** 这样做对科研结果分析及 t 检验有很大帮助; 若百分抑制率大于 60%或小于 10%, 各个测定组的结果在 t 检验运行中常常无显著性差异。

3、 CuZn-SOD 的提取：吸取与 T-SOD 浓度一致的匀浆上清（即 20% 匀浆上清）0.1ml 加入试管，再加入 CuZn-SOD 提取甲液 0.1ml 以及 CuZn-SOD 提取乙液 0.1ml （稀释倍数为 2，CuZnSOD 提取乙液不参与稀释），漩涡混匀 90 秒，静置 5 分钟，3500 转/分，离心 10 分钟，此时液体分为三层，上层为无色透亮液体（待测液体），中层为蛋白层，下层为无色透亮液体。取上层无色透亮液体按操作表进行操作（CuZn-SOD 的提取液的最佳取样量与 T-SOD 待测液通过预试验得到的最佳取样量相同即 a\*）

#### 4、操作表：

	对照管	总 SOD 测定管	CuZn-SOD 测定管
试剂一应用液(ml)	1.0	1.0	1.0
匀浆介质(ml)	a*		
TsOD 待测液(ml)		a*	
CuZnSOD 测定提取液(ml)			a*
试剂二(ml)	0.1	0.1	0.1
试剂三(ml)	0.1	0.1	0.1
试剂四应用液(ml)	0.1	0.1	0.1
用旋涡混匀器充分混匀，置 37℃ 恒温水浴 40 分钟			
显色剂(ml)	2	2	2

混匀，室温放置 10 分钟，于波长 550nm 处，1cm 光径比色杯，双蒸水调零，比色。

[注]：\* 表示 a 值为经过最佳取样量摸索实验后确定的取样量。