

水稻超氧化物歧化酶(SOD)活性测定

Determination of Superoxide Dismutase (SOD)

Activity in Rice

都浩, 王妮丽, 熊立仲*

作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学, 武汉

*通讯作者邮箱: lizhongx@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 都浩, 王妮丽, 熊立仲. (2018). 水稻超氧化物歧化酶(SOD)活性测定. *Bio-101* e1010162.

Doi: 10.21769/BioProtoc.1010162.

How to cite: Du, H., Wang, N. L. and Xiong, L. Z. (2018). Determination of superoxide dismutase (SOD) activity in rice. *Bio-101* e1010162. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010162. (in Chinese)

实验原理: 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是一种清除超氧阴离子自由基的酶, 逆境环境导致超氧阴离子自由基的积累, 诱导植物体内产生SOD。本实验依据超氧化物歧化酶抑制氮蓝四唑(NBT)在光下的还原作用来确定酶活性大小。在有氧化物质存在下, 核黄素可被光还原, 被还原的核黄素在有氧条件下极易再氧化而产生超氧阴离子自由基, 超氧阴离子自由基可将氮蓝四唑还原为蓝色的甲腓, 后者在560nm处有最大吸收峰。而SOD可清除超氧阴离子自由基, 从而抑制了甲腓的形成。于是光还原反应后, 反应液蓝色愈深, 说明酶活性愈低, 反之酶活性愈高。

实验目的: 检测水稻受到生物逆境处理后, 体内超氧化物歧化酶(SOD)活性及清除活性氧的能力。

关键词: 水稻, 氮蓝四唑(NBT), 超氧化物歧化酶 SOD, 生物逆境

材料与试剂

1. 样品袋
2. 冰盒
3. 10 ml 离心管
4. 2 ml 离心管
5. 遮光物

6. Na_2HPO_4 (天净光复科技发展有限公司)
7. NaH_2PO_4 (天净光复科技发展有限公司)
8. 甲硫氨酸 (Met) (武汉创新生物技术有限公司, catalog number: BA1081)
9. EDTA- Na_2 (生工生物, catalog number: E0105-500g)
10. 氮蓝四唑 (NBT)
11. 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 (见溶液配方)
12. 130 mmol/L 甲硫氨酸(Met)溶液 (见溶液配方)
13. 750 $\mu\text{mol/L}$ 氮蓝四唑溶液 (见溶液配方)
14. 100 $\mu\text{mol/L}$ EDTA- Na_2 溶液 (见溶液配方)
15. 20 $\mu\text{mol/L}$ 核黄素溶液 (见溶液配方)

仪器设备

1. pH 试纸 (Sigma, catalog number: P-4536)或 pH 计(Satorius, catalog number: PB-10)
2. 剪刀
3. 研钵
4. 冷冻离心机 (Eppendorf, model: centrifuge 5417R)
5. 分析天平 (Adventurer, USA)
6. 分光光度计 (BECKMAN DU[®] 640 Spectrophotometer)

实验步骤

1. 水稻组织样品准备, 到温室或田间取样, 立即放置于样品袋中, 存放于冰盒中带回实验室。
2. 酶液提取
在天平上迅速称取水稻组织0.3-0.5 g, 剪刀剪碎到预冷的研钵中, 加1 ml预冷的磷酸缓冲液, 在冰浴上研磨成浆, 研磨过程中补加缓冲液使终体积为4 ml。将研磨液倒于10 ml离心管中, 4 °C 5,000 x g离心10 min。上清液即为SOD粗提液。

3. 显色反应

取2 ml离心管若干 (要求透明度好), 其中2个离心管做对照用, 按下表加入各种溶液, 各溶液显色反应用量混匀后将1支对照管置暗处, 其他各管迅速混匀, 放置于光照培养室中反应10 min-30 min (保证各管受光情况一致, 温度高时间缩短, 温度低时间延长)。

4. SOD活性测定, 至反应结束后, 全部移入冰盒中, 其上可覆盖遮光物, 再冷冻离心12,000 x g后取适量反应液测定, 以不照光的对照管作空白, 分别测定其他各管的吸光度。

注意: 用放在暗处的缓冲液代替酶液的空白管调零, 各试剂按比例混合好 (1.3 ml 缓冲液 + 0.16 ml 甲硫氨酸 + 0.16 ml 氮蓝四唑 + 0.16 ml EDTA Na₂ + 0.06 ml 蒸馏水) (表 1), 再加 60 μl 酶液, 核黄素 0.16 ml 最后单独加入, 总体积 2.0 ml。

表 1. SOD 活性测定的试剂量

试管编号	阴性对照(不光照)	阳性对照(光照)	若干样品管
缓冲液(ml)	1.3	1.3	1.3
甲硫氨酸(ml)	0.16	0.16	0.16
氮蓝四唑(ml)	0.16	0.16	0.16
EDTANa ₂ (ml)	0.16	0.16	0.16
蒸馏水(ml)	0.06	0.06	0
酶液(ml)	0	0	0.06
核黄素(ml)	0.16	0.16	0.16
测定结果	0	A _{ck}	A _{E1}

5. SOD活性计算, 计算公式: $SOD (U/g.FW) = (A_{ck}-A_E) * V_T/A_{ck}/0.5/W/V_s$

公式中式符号表示:

V_T-总酶液量(ml)

V_s-所用酶液量(50 μl)

W-叶片鲜重(g)

A_{ck} -用缓冲液代替酶液的照光对照管吸光度

A_E -样品管吸光度

注意事项

1. 为了保证较好的实验结果，测定生理指标时，所有检测样品质量保持相近。
2. 研磨过程中可先加磷酸缓冲液 3 ml，最后再用 1 ml 磷酸缓冲液清洗研钵中残留。
3. 如果是老叶片或胁迫后含水量较低叶片，可多加磷酸缓冲液至 5-6 ml，具体用量视样品质量及组织情况而定。
4. 操作过程很多需要冰上操作，应严格执行，否则会影响酶活的测定结果。

溶液配方

1. 0.05 mol/L磷酸缓冲液(pH 7.8)
91.5 ml 0.05 M Na_2HPO_4
8.5 ml 0.05M NaH_2PO_4
2. 130 mmol/L甲硫氨酸(Met)溶液
称1.9399 g Met用磷酸缓冲液定容至100 ml
3. 750 $\mu\text{mol/L}$ 氮蓝四唑溶液
称取0.06133 g NBT用磷酸缓冲液定容至100 ml，避光保存
4. 100 $\mu\text{mol/L}$ EDTA- Na_2 溶液
称取0.03721 g EDTA- Na_2 ，用磷酸缓冲液定容至1,000 ml
5. 20 $\mu\text{mol/L}$ 核黄素溶液
称取0.0753 g核黄素用蒸馏水定容至1,000 ml，避光保存