

活性氧检测

Reactive Oxygen Detection

游均, 方玉洁, 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: 游均, 方玉洁, 熊立仲. (2018). 活性氧检测. *Bio-101* e1010170. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010170.

How to cite: You, J., Fang, Y. J. and Xiong, L. Z. (2018). Reactive oxygen detection. *Bio-101* e1010170. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010170. (in Chinese)

第一部分: NBT染色检测超氧阴离子(O₂⁻)

实验原理: 氮蓝四唑 (NBT, nitroblue tetrazolium) 与超氧阴离子发生反应并形成蓝色的甲臞 (formazan)。

实验目的: 定性、原位检测水稻各组织中的超氧阴离子(O₂⁻)。

关键词: 活性氧, 氮蓝四唑, 超氧阴离子, 水稻, 生理指标

材料与试剂

1. 50 ml离心管
2. 10 ml离心管
3. 氮蓝四唑NBT (Sigma, USA, CAS: N5514)
4. 叠氮化钠 (Sigma, USA, CAS: S8032)
5. 1 M 磷酸缓冲液 (pH 7.8)
6. 95%乙醇
7. 1 M叠氮化钠溶液 (见溶液配方)
8. NBT染液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 真空干燥箱

2. 水浴锅

实验步骤

1. 配制NBT染液(见溶液配方)并分装入50 ml离心管。
2. 用剪刀剪取水稻叶片或其他组织，立刻放入装有NBT染液的50 ml离心管中。
3. 将离心管放入真空干燥箱内，打开管盖。关闭真空干燥箱门和排气口，打开真空泵抽出箱内空气，待负压表读数降至-0.1 MPa时关闭真空泵，保持负压30 min。
4. 打开排气口，恢复箱内气压，待气压稳定后取出离心管，于室温(25 °C)静置60 min。
5. 倒弃NBT染液，加入95%乙醇并浸没样品，将离心管置于80 °C水浴中脱色，每隔10min换一次95%乙醇，待样品的绿色全部褪去后将样品取出拍照记录染色结果。

溶液配方

1. 1 M叠氮化钠溶液

称取0.6501 g叠氮化钠固体于10 ml离心管中，加入ddH₂O定容至10 ml

2. NBT染液

称取0.05 g NBT于50 ml离心管中，加入500 μl 1 M叠氮化钠溶液和500 μl 1 M磷酸缓冲液(pH 7.8)，加入ddH₂O定容至50 ml

第二部分：DAB 染色检测过氧化氢

实验原理：当过氧化物酶存在时，二氨基联苯胺 (3,3'-diaminobenzidine, DAB) 被双氧水氧化生成不溶于水的暗棕色颗粒。

实验目的：定性、原位检测水稻各组织中的双氧水。

关键词：水稻，生理指标，活性氧，过氧化氢，二氨基联苯胺

材料与试剂

1. DAB (Sigma, USA, CAS: D8001)
2. 95%乙醇
3. 0.2 M HCl

4. DAB 染液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 真空干燥箱
2. 水浴锅

实验步骤

1. 配制 DAB 染液 (见溶液配方), 将离体的叶片浸入 DAB 染液。
2. 抽真空 30 分钟, 使得叶片完全浸入 DAB 染液中。
3. 室温孵育过夜。
4. 用 95%乙醇在 80 °C 水浴中脱色, 拍照。

注意事项

NBT染色和DAB染色时, 需注意取样部位的不同对定性结果造成的影响。例如, 对不同胁迫环境下的同一批植株进行取样, 最好取生长时期相同的植株上相同部位的叶片染色进行比较。

溶液配方

1. DAB 染液

在 50 ml 离心管中加入 20 mg DAB 和 38 ml ddH₂O (或 Tris-acetate buffer, pH 5.0), 0.2 M HCl 调 pH 至以便 DAB 溶解, 配成终浓度为 0.5 mg/ml 的 DAB 染液。

注: DAB 染液现配现用, 避免自我氧化。

第三部分: 过氧化氢定量测定

实验原理: 当过氧化物酶存在时, 过氧化氢和10-乙酰基-3, 7-二羟基吩嗪(10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine, ADHP)在过氧化物酶催化下产生荧光产物试卤灵(resorufin)。用酶标仪对试卤灵进行测定可计算出过氧化氢的含量。

实验目的: 定量测定水稻各组织中过氧化氢含量。

关键词: 水稻, 生理指标, 过氧化氢

材料与试剂

1. 1.5 ml 离心管
2. 液氮 (湖北省畜牧局制氧厂)
3. 20 mM 磷酸缓冲液, pH 6.5
4. Amplex Red hydrogen peroxide/peroxidase assay kit (Molecular Probes, USA, CAS: A22188)

仪器设备

1. 离心机
2. 多功能酶标仪 (M200, Tecan, Mechelen, Belgium)
3. 酶标板

实验步骤

1. 水稻样品用液氮研磨, 取0.1 g样品至1.5 ml离心管中, 立即加入1 ml 4 °C预冷的20 mM磷酸缓冲液(pH 6.5), 充分震荡混匀。
2. 12,000 rpm低温4 °C离心10 min, 上清液转入新的离心管中用于后续实验。
3. 按照试剂盒Amplex Red hydrogen peroxide/peroxidase assay kit (Molecular Probes)提供的方法对过氧化氢进行定量测定。