

土壤超氧化物歧化酶(S-SOD)活性测定试剂盒 (WST-8 法)说明书

(货号: G0355W96 微板法 96 样)

一、产品简介:

土壤超氧化物歧化酶 (SOD) 在土壤生态系统中扮演着重要的角色。本试剂盒采用的是目前稳定性更好、灵敏度更高的 WST-8 法, WST-8 可以和黄嘌呤氧化酶(Xanthine Oxidase, XO)催化产生的超氧化物阴离子($O_2^{\cdot-}$)反应产生水溶性的甲臍染料, 后者在 450nm 处有最大吸收; SOD 可清除 $O_2^{\cdot-}$, 从而抑制甲臍的形成; 反应液颜色越深, 说明 SOD 活性愈低, 反之活性越高。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 μ L×2 支	4℃保存	临用前离心或甩几下使试剂落入底部, 每支再分别加 1.1mL 蒸馏水充分溶解, -20℃保存。
试剂三	液体 2.2mL×1 支	4℃保存	
试剂四	粉剂×4 支	4℃保存	临用前甩几下, 使粉剂落到底部, 每支加 0.1mL 试剂五振荡或超声溶解后, 再加 3.9mL 蒸馏水混匀使用 (务必加 0.1mL 试剂五溶解后再加水), 一周内用完。
试剂五	液体 1mL×1 支	4℃保存	

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、低温离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、土壤超氧化物歧化酶 (S-SOD) 的测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品和实验流程, 避免样本和试剂浪费!

1、样本制备:

- ① 取新鲜土样风干或者 37 度烘箱风干, 先粗研磨, 过 40 目筛网, 备用。
- ② 取约 0.2g 土壤, 加入 1mL 提取液, 超声波破碎提取 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 共 10min)。4℃×12000rpm 离心 10min, 取上清作为样本待测液。

2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 450nm。
- ② 测定前将试剂一、三和四 25℃水浴 5min 以上。
- ③ 用排枪操作, 以减小各孔间因加入试剂时间先后导致的误差。
- ④ 试剂四每次加样前务必混匀, 保证试剂的均一性。在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μ L)	样本管	对照管	空白管 1 (仅做一次)	空白管 2 (仅做一次)
试剂一	20	20	20	20
试剂二	20		20	
蒸馏水		20	90	110
样本	90	90		
试剂三	10	10	10	10
试剂四	60	60	60	60

充分混匀，室温（25℃）避光静置 30min（准确时间）后，于 450nm 处测定各管吸光值 A。

【注】： 1、若样本量较多，测定前可将试剂一、三和四按照 20μL:10μL:60μL 比例混成一个混合液（需依据当次检测的样本数量混合对应的试剂量），每孔务必最后一步加 90μL 该混合液。

2、若样本管数值过低，可能是：①试剂二或试剂四没有现配现用；②没有按顺序加试剂；③反应温度需室温（25℃）。

五、结果计算：

1、抑制百分率的计算：

$$\text{抑制百分率} = [(A_{\text{空白管 1}} - A_{\text{空白管 2}}) - (A_{\text{样本管}} - A_{\text{样本对照管}})] / (A_{\text{空白管 1}} - A_{\text{空白管 2}}) \times 100\%$$

控制抑制百分率尽量控制在 30-80% 范围内。1：若小于 30%，可增加取样质量 W（如增至 0.3g），或增加样本加样体积 V1（如由 90μL 增至 110μL，则试剂一不加，保持总体积不变）；2：若大于 80%，则需将样本粗提液用蒸馏水或提取液适当稀释。则改变后的 W 和 V1 和稀释倍数 D 代入公式计算。

2、S-SOD 酶活性计算：

酶活单位：在上述黄嘌呤氧化酶耦联反应体系中抑制百分率为 50% 时，反应体系中的 SOD 酶活力定义为一个酶活力单位(U/mL)。

$$\begin{aligned} \text{S-SOD 活性(U/g 重量)} &= [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V2] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 2.22 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div W \times D \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入反应体系中样本体积，0.09mL；

V2---反应体系总体积，0.2mL；

W---样本质量，g；

D---样本稀释倍数，未稀释即为 1。