

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: ADS-W-TR076-48 微板法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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^-)反应产生水溶性的甲臞染料, 后者在 450nm 处有最大吸收; SOD 可清除 O_2^- , 从而抑制甲臞的形成; 反应液颜色越深, 说明 SOD 活性愈低, 反之活性越高。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 3mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	液体 μ L×1 支	4℃ 保存	临用前离心或甩几下使试剂落入底部, 每支分别加 1.1mL 蒸馏水充分溶解, -20℃保存。
试剂三	液体 1.1mL×1 支	4℃ 保存	
试剂四	粉剂×2 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、实验器材:

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、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

- 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、检测步骤:

- 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:

试剂组分 (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 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 20 μL:10 μL:60 μL 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 90 μL 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:

抑制百分率=[(A 空白管 1-A 空白管 2)-(A 样本管-A 样本对照管)]/(A 空白管 1-A 空白管 2)×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)。

$$\text{S-SOD 活性(U/g 重量)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \times D \\ = 2.22 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div W \times D$$

V---加入提取液体积, 1mL;

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。