

## 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-F-TR076-24 分光法 24 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瓖染料, 后者在 450nm 处有最大吸收; SOD 可清除  $O_2^-$ , 从而抑制甲瓖的形成; 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 45mL×1 瓶    | 4℃保存 |  |
| 试剂一  | 液体 3mL×1 瓶     | 4℃保存 |  |
| 试剂二  | 液体 $\mu$ L×2 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 1.5mL×1 支   | 4℃保存 |  |
| 试剂四  | 粉剂×5 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:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、低温离心机、可调式移液器、研钵。

### 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 0.3g 土壤, 加入 1.5mL 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可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 450nm, 蒸馏水调零。
- ②测定前将试剂一、三和四 25℃水浴 5min 以上。
- ③试剂四每次加样前务必混匀, 保证试剂的均一性。
- ④在 1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)中依次加入:

| 试剂组分 ( $\mu$ L) | 样本管 | 对照管 | 空白管 1<br>(仅做一次) | 空白管 2<br>(仅做一次) |
|-----------------|-----|-----|-----------------|-----------------|
| 试剂一             | 40  | 40  | 40              | 40              |
| 试剂二             | 60  |     | 60              |                 |
| 蒸馏水             |     | 60  | 300             | 360             |
| 样本              | 300 | 300 |                 |                 |
| 试剂三             | 30  | 30  | 30              | 30              |

|  |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|
| 试剂四  | 320 | 320 | 320 | 320 |
| 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 0.5g), 或增加样本加样体积 V1(如由 300μL 增至 340μL, 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)。

$$\text{S-SOD 活性(U/g 重量)} = [\text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \times V2] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ = 3.75 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div W \times D$$

V---加入提取液体积, 1.5mL;

V1---加入反应体系中样本体积, 0.3mL;

V2---反应体系总体积, 0.75mL;

W---样本质量, g;

D---样本稀释倍数, 未稀释即为 1。