

土壤过氧化氢酶（Solid-Catalase, S-CAT）试剂盒说明书

(微板法 96 样)

一、产品简介：

土壤过氧化氢酶主要分解土壤中的过氧化氢，降低土壤中过度累积的过氧化氢对植物根系的危害。本试剂盒提供一种简单，灵敏，快速的测定方法，即 CAT 催化过氧化氢产生水与氧气，剩余的过氧化氢与一种高灵敏显色探针反应生成有色物质，其在 510nm 左右有最大吸收峰。通过过氧化氢的减少量来计算土壤中 CAT 酶的活力。

本试剂盒突出特点是从紫外波长（240nm：过氧化氢的检测波长）转换到可见波长（510nm）检测，无需使用石英比色皿或 UV 板。而且由于过氧化氢极其不稳定，直接检测造成读值不稳定，且蛋白质等组分在此紫外波长下也有光吸收，影响结果精确性。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 $\mu\text{L}\times 1$ 支	4°C 保存	使用前甩几下或者离心使试剂落入底部， 分别 取出 50 μL 至 六个 新的 EP 管中，再加 2mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂二	液体 22mL $\times 1$ 瓶	室温	使用前混匀几下。
试剂三	液体 35mL $\times 1$ 瓶	4°C 保存	
试剂四	液体 7mL $\times 1$ 瓶	4°C 保存	
标准品	液体 1.5mL $\times 1$ 支	4°C 保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、蒸馏水。

四、土壤过氧化氢酶（Solid-Catalase, S-CAT）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

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。

【注】：土壤风干，可减少土壤中水分对于实验的干扰；；土壤过筛，保证取样的均匀细腻；

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 510nm。

② 试剂一事先按照试剂配制要求配制好，再进行以下操作。

【建议】：若一次性样本较多，离心数量有限，可分批操作，待一批样本加完试剂二开始离心时，再进行下一批操作（土壤样本可一次性称完，分批按照加样表操作）。

③ 在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	无基质管	无土管 (仅做一次)
土样 (g)	0.1	0.1	
蒸馏水	800	800	800
室温 (25°C) 震荡 (如: 摇床) 培养 30min,			
试剂一	100		100
蒸馏水		100	

混匀，室温（25℃）10min（ 务必 每隔 2min 摇晃一次）。			
试剂二	100	100	100
12000rpm，4℃或室温离心 10min，上清液 务必 全部转移至新的 EP 管中，待测。			

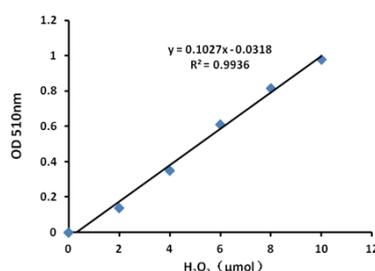
④ 显（粉）色反应：在 96 孔板中依次加入：

上清液	5	5	5
试剂三	165	165	165
试剂四	30	30	30
室温（25℃）静置 5min， 务必立即 在 510nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{无土管}} - (A_{\text{测定管}} - A_{\text{无基质管}})$ 。			

- 【注】**：1. 无土管的颜色最深（若无土管的值超过 2，可对试剂一用蒸馏水适当稀释后再使用），若测定管颜色很浅接近无色，说明样本里面过氧化氢酶含量很高，则震荡 10min 的时间缩短（如 5min）或减少土壤取样质量 W。则改变后的 T 和 W 重新代入公式计算。
2. 若一次性检测样本较多，在显色反应阶段可酌情分批操作和读值，为保证数据的精确性，显色反应阶段最好半个小时内完成。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.1027x - 0.0318$ ；x 为标准品摩尔质量（ μmol ），y 为 ΔA 。



2、单位定义：每小时每克土样催化 $1\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ 降解定义为一个酶活力单位。

$$S\text{-CAT}(\mu\text{mol/h/g 土样}) = [(\Delta A + 0.0318) \div 0.1027] \div W \div T = 58.4 \times (\Delta A + 0.0318) \div W$$

T---反应时间，10min=1/6h；

W---土壤样本实际取样量。

附：标准曲线制作过程：

- 1 把标准品（ $100\mu\text{mol/mL}$ ）稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 20, 40, 60, 80, $100\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 2 按照无土管加样顺序（ $100\mu\text{L}$ 试剂一换成 $100\mu\text{L}$ 标准品，其他不变）依次加入试剂测定，标准品的摩尔质量作为横坐标，吸光值作为纵坐标，即得标准曲线。

参考文献：

- 1、Trasar-Cepeda, C., F. Camiña, M.C. Leirós, and F. Gil-Sotres. 1999. An improved method to measure catalase activity in soils. *Soil Biol. Biochem.* 31:483-485
- 2、Holz, F. 1986. Automatisierte, photometrische Bestimmung der Aktivität von Bodenzymen durch Anwendung (enzymatisch)-oxidativer Kupplungsreaktionen im Durchfluß. I. Mitteilung: Die Bestimmung der Katalaseaktivität. *Landwirtsch. Forsch.* 39:139-153.