

土壤过氧化氢酶 (Soil-Catalase, S-CAT) 试剂盒说明书

(货号: G0303F 分光法 24 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	用前甩几下或者离心使试剂落入底部,分别取出 25 μL 至两个新的 EP 管中,再加 1.5mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂二	液体 6mL $\times 1$ 支	室温	使用前混匀几下。
试剂三	液体 50mL $\times 1$ 瓶	4°C 保存	
试剂四	液体 8mL $\times 1$ 瓶	4°C 保存	
标准品	液体 1mL $\times 1$ 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:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、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 (Soil-Catalase, S-CAT) 活性测定:

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

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,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 分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 510nm,蒸馏水调零。

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	0	100
蒸馏水	0	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。			

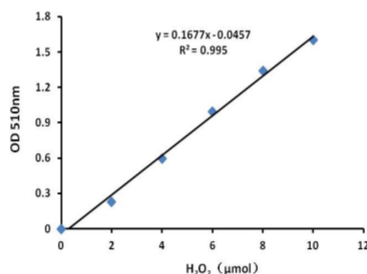
④ 显色反应：在 EP 管中依次加入：

上清液	25	25	25
试剂三	825	825	825
试剂四	150	150	150
室温（25℃）静置 3min，全部转移到 1mL 的玻璃比色皿（光径 1cm）中，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，则反应 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。
3. 若 ΔA 小于 0.01，可增加土壤的取样质量 W，或延长反应时间 T（如由室温（25℃）10min 增至 30min 或更长），则改变后的 W 和 T 需带入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.1677x - 0.0457$ ；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。

$$\text{S-CAT}(\mu\text{mol/h/g 土样}) = [(\Delta A + 0.0457) \div 0.1677] \div W \div T = 35.8 \times (\Delta A + 0.0457) \div W$$

T---反应时间，10 min=1/6h；

W---土壤样本实际取样量，g。

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.