

土壤过氧化氢酶（Solid-Catalase, S-CAT）试剂盒说明书

(货号: BP10125W-96 微板法 96 样 有效期: 9 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 1 支	4℃避光保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部 (可手动甩一甩); 2. 取出 50 μL 至新的 EP 管中, 再加 2mL 蒸馏水充分溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 22mL×1 瓶	室温	1. 使用前混匀几下; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 35mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 7mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准品	液体 1.5mL×1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

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:

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、检测步骤:

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:

试剂组分 (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℃) 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。			

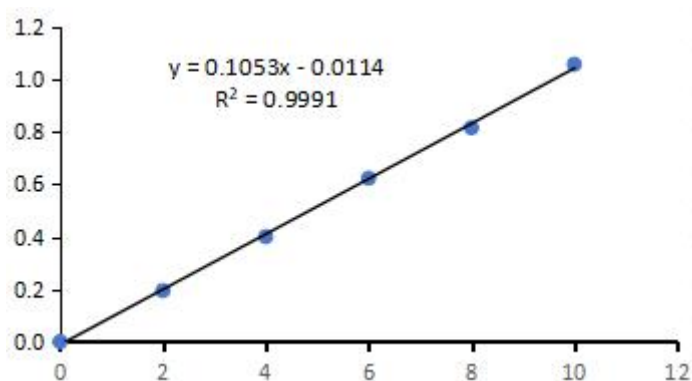
④ 显 (粉) 色反应: 在 96 孔板中依次加入:

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: $y = 0.1053x - 0.0114$; 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。

$$S\text{-CAT}(\mu\text{mol/h/g 土样}) = [(\Delta A + 0.0114) \div 0.1053] \div W \div T = 56.98 \times (\Delta A + 0.0114) \div W$$

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 标准品母液浓度为 $100\mu\text{mol/mL}$ 。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 20, 40,

60, 80, 100 $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

标品浓度 $\mu\text{mol/mL}$	0	20	40	60	80	100
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据无土管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线；标准品的摩尔质量作为横坐标，吸光值作为纵坐标。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	100	
蒸馏水	800	900
混匀，室温 (25°C) 10min (务必每隔 2min 摇晃一次)。		
试剂二	100	100
上清液待测。		

显色反应：在 EP 管中依次加入：

上清液	5	5
试剂三	165	165
试剂四	30	30
室温 (25°C) 静置 5min，务必立即在 510nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		

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 Bodenenzymen durch Anwendung (enzymatisch)-oxidativer Kupplungsreaktionen im Durchfluß. I. Mitteilung: Die Bestimmung der Katalaseaktivität. Landwirtsch. Forsch. 39:139-153.