# 土壤过氧化氢酶（Solid-Catalase，S-CAT）试剂盒说明书

(货号：ADS-F-TR005-24　分光法 24 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）；<br>2. 取出 25μL 至新的 EP 管中，再加 1.5mL 蒸馏水充分溶解备用；<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。 |
| 试剂二 | 液体 6mL×1 瓶 | 室温 | 1. 使用前混匀几下；<br>2. 保存周期与试剂盒有效期相同。 |
| 试剂三 | 液体 50mL×1 瓶 | 4℃保存 | |
| 试剂四 | 液体 8mL×1 瓶 | 4℃避光保存 | |
| 标准品 | 液体 1mL×1 支 | 4℃避光保存 | 1. 若重新做标曲，则用到该试剂；<br>2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制；<br>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）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、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，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 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 | 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：

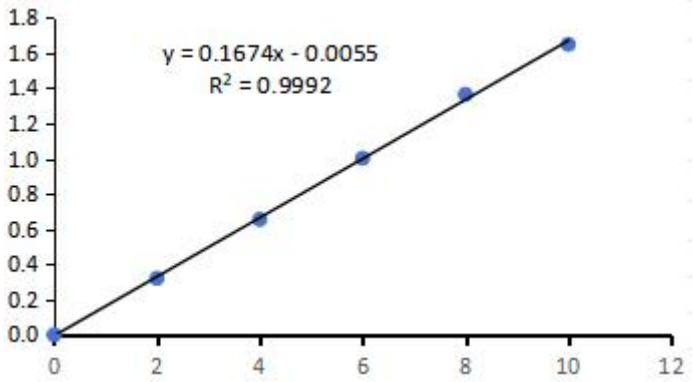
| | | | |
|---|---|---|---|
| 上清液 | 25 | 25 | 25 |
| 试剂三 | 825 | 825 | 825 |
| 试剂四 | 150 | 150 | 150 |
| 室温（25℃）静置 3min，全部转移到 1mL 的玻璃比色皿（光径 1cm）中，**务必立即**在 510nm 下读取吸光值 A，△A=A 无土管-(A 测定管-A 无基质管)。 | | | |

**【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。

## 五、结果计算：

1、标准曲线：y = 0.1674x - 0.0055；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 1μmol $H_2O_2$ 降解定义为一个酶活力单位。

S-CAT(μmol/h/g 土样)=[(△A+0.0055)÷0.1674]÷W÷T=35.8×(△A+0.0055)÷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　标准品母液浓度为 100μmol/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 μmol/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 μmol/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℃）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 | 25 | 25 |
|---|---|---|
| 试剂三 | 825 | 825 |
| 试剂四 | 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，△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.