

土壤过氧化氢酶（Solid-Catalase, S-CAT）试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

S-CAT 是土壤微生物代谢的重要酶类，在 H_2O_2 清除系统中具有重要作用。

测定原理：

H_2O_2 在 240nm 下有特征吸收峰，通过测定与土壤反应后溶液在此波长下吸光度的变化，即可反应 S-CAT 活性的高低。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板（UV 板）和蒸馏水

试剂组成和配制：

试剂一：液体 300 μ L $\times$ 1 瓶，4 $^{\circ}$ C 保存；临用前加入 29.7mL 蒸馏水充分溶解后待用；用不完的试剂 4 $^{\circ}$ C 保存；

试剂二：粉剂 $\times$ 1 瓶，4 $^{\circ}$ C 保存；临用前加入 1mL 蒸馏水充分溶解待用，用不完的试剂 4 $^{\circ}$ C 保存（如出现结晶析出，60 $^{\circ}$ C-90 $^{\circ}$ C 水浴溶解后使用）；

试剂三：液体 3mL $\times$ 1 瓶，4 $^{\circ}$ C 保存。

样品处理：

新鲜土样自然风干或 37 度烘箱风干，过 30~50 目筛。

测定步骤：

1、 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 240nm，蒸馏水调零。

2、 测定前务必准备 96 孔 UV 板一块（UV 板不是普通酶标板，普通酶标板只能透过可见光，不能透过紫外光，检测波长小于 340nm 务必使用 UV 板）。

3、 加样表

试剂名称	测定管	无基质管	无土管
风干土样（g）	0.03	0.03	
试剂一（ μ L）	260		260
蒸馏水（ μ L）		260	

25 $^{\circ}$ C 振荡培养 20min

试剂二（ μ L）	10	10	10
---------------	----	----	----

混匀 8000g，25 $^{\circ}$ C 离心 5min，取 180 μ L 上清

试剂三（ μ L）	20	20	20
---------------	----	----	----

混匀，240nm 处记录各管吸光值 A。

注意：每个测定管要设一个无基质管，无土管只要做一管。

S-CAT 活性计算：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

单位的定义：每天每 g 风干土样催化 $1\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ 降解定义为一个酶活力单位。

计算公式：S-CAT ($\mu\text{mol/d/g}$) = $[(A_{\text{无土管}} - A_{\text{测定管}} + A_{\text{无基质管}}) \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div W \div T = 16.5 \times (A_{\text{无土管}} - A_{\text{测定管}} + A_{\text{无基质管}})$

V 反总：反应体系总体积， 3×10^{-4} L； ϵ ：过氧化氢摩尔消光系数， 4.36×10^4 L / mol / cm；d：比色皿光径，1cm； T：反应时间，20 min=1/72d； W：样本质量，0.03g。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

单位的定义：每天每 g 风干土样催化 $1\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ 降解定义为一个酶活力单位。

计算公式：S-CAT ($\mu\text{mol/d/g}$) = $[(A_{\text{无土管}} - A_{\text{测定管}} + A_{\text{无基质管}}) \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div W \div T = 33 \times (A_{\text{无土管}} - A_{\text{测定管}} + A_{\text{无基质管}})$

V 反总：反应体系总体积， 3×10^{-4} L； ϵ ：过氧化氢摩尔消光系数， 4.36×10^4 L / mol / cm；d：96 孔板光径，0.5cm； T：反应时间，20 min=1/72d； W：样品质量，0.03g。