

土壤过氧化氢酶（S-CAT）检测试剂盒（微量法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

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。

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

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。

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

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。