

土壤碱性蛋白酶测试盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
SMHA0-C24	土壤碱性蛋白酶(S-ALPr)试剂盒	24T	常量法
SMHA0-C48		48T	

一、测定意义：

土壤蛋白酶是土壤中的一种重要的酶类，它能水解各种蛋白质以及肽类等化合物为氨基酸，是高等植物的氮源之一。土壤蛋白酶由于微生物活动、植物根系分泌和动植物残体的分解而富集起来，成为土壤中的一种重要胞外酶，具有离体活性，能够参与土壤的氮素循环，是促进土壤氮循环的重要成分。

二、测定原理：

以酪蛋白为底物，在碱性条件下，土壤碱性蛋白酶可催化底物水解生成酪氨酸，酪氨酸还原磷钨酸化合物生成钨蓝，在 680nm 有特征吸收峰，根据颜色深浅可测定土壤中酸性蛋白酶活性。

三、试剂盒组成：

试剂名称	试剂装量(24T)	试剂装量(48T)	保存条件
试剂一	20mL×1 瓶	30mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂二	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃ 保存
试剂二应用液的配制：每瓶粉剂加入 10mL 试剂一，沸水浴搅拌充分溶解后待用			
试剂三	15mL×1 瓶	25mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂四	50mL×1 瓶	90mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂五	10mL×1 瓶	20mL×1 瓶	2-8℃ 保存
标准品(10μmol/mL)	1.5mL×1 支	1.5mL×1 支	2-8℃ 保存

四、操作步骤：

一、样本前处理

新鲜土样自然风干或者 37℃ 烘箱风干，过 30-50 目筛。

二、操作步骤

1、培养反应：

	测定管	对照管	无土基质管
土样 (g)	0.1	0.1	
试剂一 (μL)	100	100	100
蒸馏水 (μL)	-	200	
试剂二 (μL)	200	-	200
混匀，37℃ 孵育 24h			

试剂三 (μL)	200	200	200
----------	-----	-----	-----

混匀, 10000 转/min 常温离心 10min, 取上清液备用。

2、显色反应:

	测定管	对照管	无土基质管	标准管
稀释后的上清液 (μL)	150	150	150	-
不同浓度的标准品 (μL)	-	-	-	150
试剂四 (μL)	750	750	750	750
试剂五 (μL)	150	150	150	150

混匀, 40℃水浴 20min, 10000rpm 室温离心 10min, 取上清液于
波长 680nm, 1cm 光径, 蒸馏水调零, 测定各管吸光度值。

注: 每个待测样本需设定一个测定管和一个对照管, 无土基质管只需要做一管;

五、单位定义与计算:

单位定义: 每天每克风干土壤中生成 1μmol 的酪氨酸为一个酶活力单位

计算公式: 根据标准曲线, 将吸光度值带入标曲计算出上清液中浓度 Y (μmol/mL)

$$S\text{-碱性蛋白酶}(U/g \text{ 土样}) = (Y_{\text{测定管}} - Y_{\text{对照管}} - Y_{\text{无土基质管}}) \times V_{\text{反应}} \div W \div T$$

T: 反应时间, 1d;

V_{反应}: 反应体系总体积, 0.5mL;

W: 样本质量, g。

六、注意事项:

- 1、比色时, 溶液呈现蓝色, 在 1h 内保持稳定;
- 2、不同土壤样本的碱性蛋白酶差异较大, 先做预实验确认样本稀释倍数。通常情况下测定管需要 1-5 倍稀释, 对照管和基质管不稀释;
- 3、不同仪器测定出来的吸光度值存在差异, 实验时需同时测定标准曲线。

附录 I：标准曲线的制备

1、前处理：

将 10 $\mu\text{mol/mL}$ 的标准品用蒸馏水稀释成 0、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5 $\mu\text{mol/mL}$ 标准液进行标准曲线的制备。

2、操作表：

标准品浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)	0	0.02	0.05	0.1	0.2	0.5
标准品 (μL)	150	150	150	150	150	150
试剂四 (μL)	750	750	750	750	750	750
试剂五 (μL)	150	150	150	150	150	150

混匀，40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20min，10000rpm 室温离心 10min，取上清液于波长 680nm，1cm 光径，蒸馏水调零，测定各管吸光度值。

3、测定结果：

标准品浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)	吸光度值	绝对吸光度值
0.00	0.002	0.000
0.02	0.042	0.040
0.05	0.101	0.099
0.10	0.179	0.177
0.20	0.334	0.332
0.50	0.810	0.808

土壤碱性蛋白酶标准曲线

$$y = 0.6248x - 0.0066$$
$$R^2 = 0.9995$$

