

## 土壤中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
SMHA9-M48	土壤中性蛋白酶(S-NPr)试剂盒	48T	微量法
SMHA9-M96		96T	

### 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，在酸性条件下，土壤中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中性蛋白酶活性。

### 三、试剂组成

试剂名称	试剂装量 (48T)	试剂装量 (96T)	保存条件
试剂一	20mL×1 瓶	35mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂二	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	4℃ 保存
试剂二应用液的配制：每瓶粉剂加入 10mL 试剂一，沸水浴搅拌溶解后待用			
试剂三	12mL×1 瓶	25mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂四	30mL×1 瓶	50mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂五	6mL×1 瓶	10mL×1 瓶	4℃ 保存
标准品(10μmol/mL)	1.5mL×1 支	1.5mL×1 支	4℃ 保存

### 四、操作步骤

#### 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。

#### 操作步骤

##### 1、培养反应：

	测定管	对照管	基质管
土样 (g)	0.05	0.05	-
试剂一 (μL)	50	50	50
蒸馏水 (μL)	-	100	-
试剂二 (μL)	100	-	100
混匀，37℃ 孵育 24h			

试剂三 (μL)	100	100	100
----------	-----	-----	-----

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	基质管	标准管
稀释后的上清液 (μL)	40	40	40	-
不同浓度的标准品 (μL)	-	-	-	40
试剂四 (μL)	200	200	200	200
试剂五 (μL)	40	40	40	40

混匀, 40℃水浴 20min, 10000rpm 室温离心 10min, 取上清液于  
 波长 680nm, 酶标仪测定各管吸光度值。

**注: 每个待测样本需设定一个测定管和一个对照管, 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)

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

**T:** 反应时间, 1d;

**V<sub>反应</sub>:** 反应体系总体积, 0.25mL;

**W:** 样本质量, 0.05g。

## 六、注意事项

- 1、比色时, 溶液呈现蓝色, 在 1h 内保持稳定
- 2、不同土壤样本的中性蛋白酶差异较大, 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。

## 七、公司介绍

陌凡生物科技有限公司是一家专业从事转基因检测、食品安全以及动植物疫病检测为核心业务的生物科技公司。能够为客户提供动植物疫病检测试剂、小分子抗原抗体、植物激素、植物抗体、重组蛋白等优质产品。自主研发了涵盖分子生物学、细胞生物学、免疫学、生物医学等领域的各种试剂盒。产品覆盖面广, 品质可靠。

## 附录 I：中性蛋白酶标准曲线的制备

### 1、前处理：

将 10 $\mu$ mol/mL 的标准品用蒸馏水稀释成 0、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 $\mu$ mol/mL 标准液进行标准曲线的制备。

### 2、操作表：

标准品浓度 ( $\mu$ mol/mL)	0	0.02	0.05	0.1	0.2	0.5	1.0
标准品 ( $\mu$ L)	40	40	40	40	40	40	40
试剂四 ( $\mu$ L)	200	200	200	200	200	200	200
试剂五 ( $\mu$ L)	40	40	40	40	40	40	40

混匀，40 $^{\circ}$ C 水浴 20min，10000rpm 室温离心 10min，取上清液于波长 680nm，酶标仪测定各管吸光度值。

### 3、测定结果：

标准品浓度 ( $\mu$ mol/mL)	吸光度值	绝对吸光度值
0.00	0.0123	0
0.02	0.0310	0.0187
0.05	0.0564	0.0441
0.10	0.0987	0.0864
0.20	0.1807	0.1684
0.50	0.4251	0.4128
1.00	0.8042	0.7919

