

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_{反应}: 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 μ 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 μ mol/mL 标准液进行标准曲线的制备。

2、操作表：

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

