

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0834

Size: 50T/24S

土壤中性蛋白酶检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义：

土壤蛋白酶参与土壤中存在的氨基酸、蛋白质以及其他含蛋白质氮的有机化合物的转化，其水解产物是高等植物的氮源之一。土壤中性蛋白酶在中性环境下催化蛋白质水解，与土壤有机质含量、氮素及其他土壤性质有关。

二、测定原理：

中性条件下，土壤中性蛋白酶可将酪蛋白水解产生酪氨酸；在碱性条件下，酪氨酸还原磷钼酸化合物生成钨蓝，在 680nm 有特征吸收峰。

三、需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、水浴锅、可调式移液枪、1mL 比色皿、蒸馏水、50 目筛（或更小）。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加入 10mL 试剂一，沸水浴搅拌溶解后待用
试剂三	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加入 10mL 蒸馏水充分溶解待用
试剂四	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	液体 2mL×1 支	4℃保存	0.2 μmol/mL 酪氨酸溶液

五、样品处理：

新鲜土样自然风干或 37℃烘箱风干，过 30~50 目筛。

六、操作步骤：

1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 680nm，蒸馏水调零。

2、样本测定：

试剂名称	测定管	对照管	标准管	空白管
风干土样 (g)	0.1	0.1	—	—
试剂一 (μL)	100	100	—	—
试剂二 (μL)	200		—	—
混匀后，37℃反应 24h，期间振荡 5-6 次，使土样与反应液充分接触。			—	—
试剂三 (μL)	200	200	—	—
试剂二 (μL)	—	200	—	—
混匀，10000rpm 室温离心 10min，取上清液			—	—
上清液 (μL)	220	220	—	—
标准液 (μL)	—	—	220	—
蒸馏水 (μL)	—	—	—	220
试剂四 (μL)	650	650	650	650
试剂五 (μL)	130	130	130	130
混匀，40℃水浴 10min，10000rpm 室温离心 10min，取上清液于 680nm 下读取各管吸光值 A，分别记为 A 测定管、A 对照管、A 标准管、A 空白管，计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。				

注意：标准管、空白管只需测一次。每个测定管设一个对照管。

七、土壤中性蛋白酶活性计算：

单位定义：每天每 g 土样中产生 1 μmol 酪氨酸为一个土壤中性蛋白酶活力单位。

土壤中性蛋白酶(U/g)=C 标准 $\times \Delta A$ 测定 $\div \Delta A$ 标准 $\times V$ 反总 $\div W \div T$

= 0.1 $\times \Delta A$ 测定 $\div \Delta A$ 标准 $\div W$ 。

C 标准管：标准管浓度，0.2 $\mu\text{mol/mL}$ ；V 反总：酶促反应总体积，0.5mL；T：反应时间，1d；W：样本质量，g。

八、注意事项

当吸光值大于 1 时，建议将上清液稀释后进行测定，计算时注意乘以稀释倍数。