

土壤中性蛋白酶（S-NPT）试剂盒说明书

（货号：ADS-W-TR017 微板法 48 样）

有效期：6 个月

一、产品简介：

蛋白酶是广泛存在于土壤中的一大酶类，它能水解各种蛋白质以及肽类等化合物为氨基酸，因此土壤蛋白酶的活性与土壤中氮素的转化状况有极其重要的关系。

土壤中性蛋白酶（S-NPT）在中性条件下将酪蛋白水解产生酪氨酸；酪氨酸与福林酚在碱性条件下反应生成蓝色化合物；该蓝色物质在 680nm 有特征吸收峰，进而得 S-NPT 酶活，由于底物酪蛋白自身含有多种氨基酸，所以在检测过程中必须设置带有底物酪蛋白的对照，以扣除有干扰的背景值，排除假阳性。

二、测试盒组成和配制：

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|------|-----------------|------|---|
| 试剂一 | 液体 120mL×1 瓶 | 4℃保存 | |
| 试剂二 | 粉剂 2 瓶 | 4℃保存 | 临用前甩几下使粉剂落入底部，每瓶加入 3mL 试剂三 90℃加热搅拌至分散（约 10-20min），再加 27mL 试剂一搅拌至溶解（约需 30min）；配置完的试剂 4℃保存，三天内用完。 |
| 试剂三 | 液体 10mL×1 瓶 | 4℃保存 | 用前摇匀。 |
| 试剂四 | 液体 60mL×1 瓶 | 4℃保存 | 用前摇匀。 |
| 试剂五 | 液体 35mL×1 瓶 | 4℃保存 | 用前摇匀。 |
| 试剂六 | 液体 12.5mL×1 棕色瓶 | 4℃保存 | 现用现配，临用前加 25mL 蒸馏水，4℃保存，一星期内用完。 |
| 标准品 | 粉体 1 支 EP | 4℃保存 | 若重新做标曲，则用到该试剂。 |

【注】：试剂二若在磁力搅拌器（带温控）上溶解，可用锡箔纸或保鲜膜盖住烧杯，以免溶解过程中水分蒸发过快。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、水浴锅、磁力搅拌器、可调式移液枪、蒸馏水

四、土壤中性蛋白酶（S-NPT）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

取新鲜土样或者 37 度烘箱风干（需先粗研磨），过 40 目筛网备用。

2、上机检测：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 680nm。
- ② 配制好的试剂二需预先 50℃水浴 10min。
- ③ 在 EP 管中依次加入下列试剂培养：

| 试剂名称（μL） | 测定管 | 对照管 |
|----------|-----|-----|
| | | |

| | | |
|--|----------------------|----------------------|
| 土样 (g) | 0.2g 鲜土 或 0.1g 干土 | 0.2g 鲜土 或 0.1g 干土 |
| 试剂一 | 500 | 500 |
| 试剂二 | 500 | |
| 50°C振荡培养 2h, 同时, 余下的试剂二须单独 50°C振荡培养 2h | | |
| 上步单独 50°C培养过的试剂二 | | 500 |
| 试剂四 | 500 | 500 |
| 混匀, 立即 1700rpm (须准确), 4°C离心 10min, 上清液待用 | | |

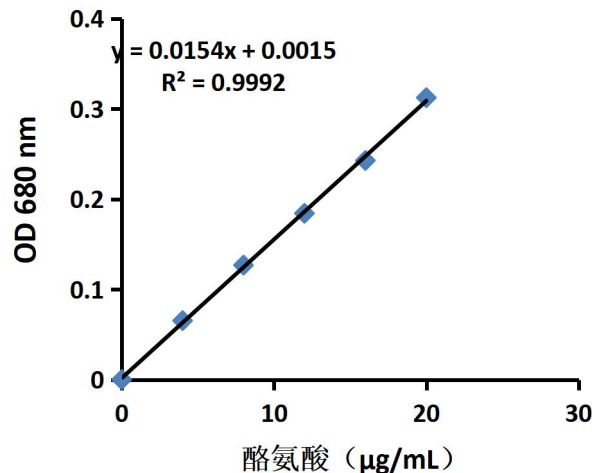
④ 显色反应: 在 EP 管中依次加入:

| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 对照管 |
|--|-----|-----|
| 上清液 | 200 | 200 |
| 试剂五 | 300 | 300 |
| 试剂六 | 200 | 200 |
| 室温静置 20min (若仍浑浊, 可以延长静置时间至 30min 或 1700rpm 离心 10min), 取 200μL 于 96 孔板中, 于 680nm 读取吸光值 A, ΔA=A 测定管-A 对照管 (每个样本须做一个自身对照)。 | | |

【注】: 若 ΔA 的值低于 0.01, 可以加样土样取样量 W (如两倍的土壤质量), 或增加反应时间 T (如由 2h 增加到 6h 或更长), 则改变后的 W 和 T 需带入公式重新计算。

五、结果计算:

1、标曲线准方程: $y = 0.0154x + 0.0015$, x 是标准品浓度 (μg/mL), y 是 ΔA。



2、单位定义: 每小时每克鲜土中产生 1μg 酪氨酸为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{土壤中蛋白酶(S-NPT)} (\mu\text{g/h/g 鲜土}) &= (\Delta A - 0.0015) \div 0.0154 \times V1 \div W1 \div T \\ &= 48.8 \times (\Delta A - 0.0015) \div W1 \end{aligned}$$

3、单位定义: 每小时每克干土中产生 1μg 酪氨酸为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{同等质量的鲜土 (参与实际反应的鲜土质量) 在 } 105^\circ\text{C} \text{ 烘干, 即得相应的干土质量。} \\ \text{土壤中蛋白酶(S-NPT)} (\mu\text{g/h/g 干土}) &= (\Delta A - 0.0015) \div 0.0154 \times V1 \div W2 \div T \\ &= 48.8 \times (\Delta A - 0.0015) \div W2 \end{aligned}$$

V1---培养步骤中总的反应体积, 1500μL = 1.5mL;

T---反应时间，2h；

W1---样本质量，以实际称取鲜土质量为准；

W2---相对应的干土质量。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）：标准品溶解于 100mL 的 0.1mol/L 的盐酸溶液中（母液需在两天内用且-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 4, 8, 12, 16, 20. $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的显色反应阶段加样表依次加样，根据结果即可制作标准曲线。

