

Soil Neutral protease (S-NPT) Activity Assay Kit

土壤中蛋白酶（S-NPT）试剂盒说明书

货号: BN72580 | 方法: 可见分光法 | 规格: 24 样

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 mg×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 30mL×1 瓶	4℃保存	用前摇匀。
试剂五	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	用前摇匀。
试剂六	液体 5mL×1 棕色瓶	4℃保存	现用现配，临用前加 10mL 蒸馏水，4℃保存，一星期内用完。
标准品	粉体 mg×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:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、水浴锅、磁力搅拌器、可调式移液枪

四、土壤中蛋白酶（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 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 680nm，蒸馏水调零。
- 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℃振荡培养 2h, 同时, 余下的试剂二须单独 50℃振荡培养 2h		
上步单独 50℃培养过的试剂二		500
试剂四	500	500
混匀, 立即 1700rpm (须准确), 4℃离心 10min, 上清液待用		

④ 显色反应: 在 EP 管中依次加入:

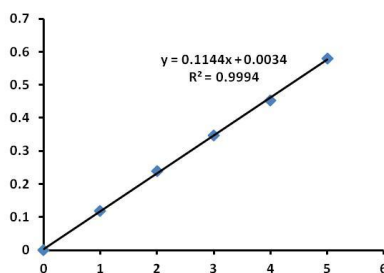
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
上清液	250	250
试剂五	375	375
试剂六	250	250
室温静置 20min (若仍浑浊, 可以延长静置时间至 30min 或 1700rpm 离心 10min), 取全部上清液于 1mL 玻璃比色皿中, 于 680nm 读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。		

注意: 本操作流程适用于绝大多数常规样本检测, 实验条件可根据实际样本状态适度微调;

针对特殊类型样本, 我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.1144x + 0.0034$, x 是标准品质量 (μg), 是 ΔA 。



标准曲线示意图

说明: 标准曲线由标准品测定获得, 具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

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。

$$\begin{aligned} \text{土壤中性蛋白酶(S-NPT)} (\mu\text{g/h/g 鲜土}) &= (\Delta A - 0.0034) \div 0.1144 \div (W1 \times V1 \div V2) \div T \\ &= 26.2 \times (\Delta A - 0.0034) \div W1 \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{同等质量的鲜土 (参与实际反应的鲜土质量) 在 } 105^\circ\text{C} \text{ 烘干, 即得相应的干土质量。} \\ \text{土壤中性蛋白酶(S-NPT)} (\mu\text{g/h/g 干土}) &= (\Delta A - 0.0034) \div 0.1144 \div (W2 \times V1 \div V2) \div T \\ &= 26.2 \times (\Delta A - 0.0034) \div W2 \end{aligned}$$

V1---显色反应步骤中加入的上清液体积, 250μL = 0.25mL;

V2---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。