

## 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、指标介绍：

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：

| 试剂组分 | 试剂规格          | 存放温度   | 注意事项                                                                                                                         |
|------|---------------|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 试剂一  | 液体 120mL×1 瓶  | 4℃ 保存  |                                                                                                                              |
| 试剂二  | 粉剂 2 瓶        | 4℃ 保存  | 每瓶：<br>1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）；<br>2. 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）；<br>3. 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  | 1. 用前摇匀；<br>2. 保存周期与试剂盒有效期相同。                                                                                                |
| 试剂四  | 液体 60mL×1 瓶   | 4℃ 保存  | 1. 用前摇匀；<br>2. 保存周期与试剂盒有效期相同。                                                                                                |
| 试剂五  | 液体 35mL×1 瓶   | 4℃ 保存  | 1. 用前摇匀；<br>2. 保存周期与试剂盒有效期相同。                                                                                                |
| 试剂六  | 液体 12.5mL×1 瓶 | 4℃避光保存 | 1. 现用现配，临用前加 25mL 蒸馏水；<br>2. 4℃保存，一星期内用完。                                                                                    |
| 标准品  | 粉体 1 支 EP     | 4℃ 保存  | 1. 若重新做标曲，则用到该试剂；<br>2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制；<br>3. 溶解后的标品一周内用完。                                                                 |

【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、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、磁力搅拌器、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

### 四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

## 1、样本提取：

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、检测步骤：

- 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：

| 试剂组分 (μL)                           | 测定管                  | 对照管                  |
|-------------------------------------|----------------------|----------------------|
| 土样 (g)                              | 0.2g 鲜土<br>或 0.1g 干土 | 0.2g 鲜土<br>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 |                      |                      |

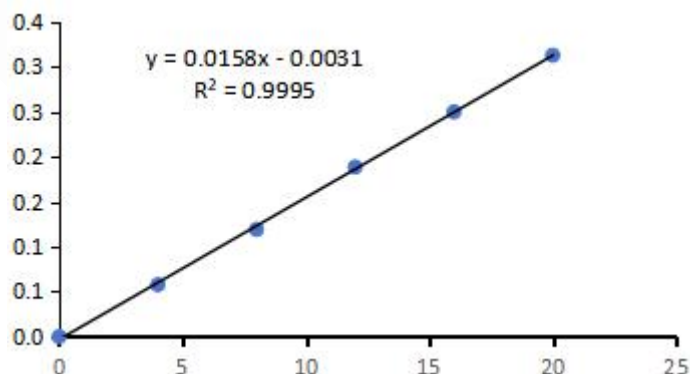
- ④ 显色反应：在 EP 管中依次加入：

| 试剂组分 (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，<br>$\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ （每个样本须做一个自身对照）。 |     |     |

【注】：若  $\Delta A$  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： $y = 0.0158x - 0.0031$ ，x 是标准品浓度 (μg/mL)，y 是  $\Delta A$ 。



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。

$$\text{土壤中性蛋白酶(S-NPT)} (\mu\text{g/h/g 鲜土}) = (\Delta A + 0.0031) \div 0.0158 \times V1 \div W1 \div T \\ = 47.5 \times (\Delta A + 0.0031) \div W1$$

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。

同等质量的鲜土（参与实际反应的鲜土质量）在 105℃烘干，即得相应的干土质量。

$$\text{土壤中蛋白酶(S-NPT)} (\mu\text{g/h/g 干土}) = (\Delta A + 0.0031) \div 0.0158 \times V1 \div W2 \div T \\ = 47.5 \times (\Delta A + 0.0031) \div W2$$

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 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℃保存），标准品母液浓度为 100μg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 4, 8, 12, 16, 20. μg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下：

|                                                   |     |     |     |     |     |     |
|---------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 吸取标准品母液 200uL，加入 800uL 蒸馏水，混匀得到 20ug/mL 的标品稀释液待用。 |     |     |     |     |     |     |
| 标品浓度<br>μg/mL                                     | 0   | 4   | 8   | 12  | 16  | 20  |
| 标品稀释液<br>uL                                       | 0   | 40  | 80  | 120 | 160 | 200 |
| 水 uL                                              | 200 | 160 | 120 | 80  | 40  | 0   |
| 各标准管混匀待用。                                         |     |     |     |     |     |     |

- 3 依据显色反应阶段测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

| 试剂名称 (μL)                                                                                                                | 标准管 | 0 浓度管 (仅做一次) |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|--------------|
| 标品                                                                                                                       | 200 |              |
| 蒸馏水                                                                                                                      |     | 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， $\Delta A = A - \text{测定-0 浓度管}$ 。 |     |              |