

土壤碳酸酐酶 (S-CA)活性测定试剂盒说明书

(货号: ADS-F-TR077 分光法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

碳酸酐酶 (Carbonic Anhydrase, CA, EC4.2.1.1) 是一种含锌的金属酶, 碳酸酐酶的结构多样, 但都含有一个活性中心, 其中锌离子(Zn^{2+})是其发挥催化作用的关键。

本试剂盒采用碳酸酐酶与乙酸对硝基苯酯反应, 生成对硝基苯酚 (PNP), 在 405nm 处有最大吸光值, 通过上升速率反映碳酸酐酶的活性。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 120mL×2 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 6 支	4℃保存	每支: 1. 临用前甩几下或离心使粉体落入底部, 每支分别加 1.5mL 无水乙醇混匀溶解, 混匀后可-20℃分装保存(尽量避免反复冻融), 三天内用完。
标准品	粉剂 1 支	4℃保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、实验器材:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm, 狭缝 3mm)、离心管 (EP 管)、低温离心机、恒温培养箱 (或烘箱、金属浴)、可调式移液器、研钵、蒸馏水、水浴锅、无水乙醇。

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:

取新鲜土样风干或者 37 度烘箱风干, 先粗研磨, 过 40 目筛网, 备用。

【注】: 土壤风干, 减少土壤中水分对于实验的干扰;

2、检测步骤:

① 分光光度计预热 30 min, 设置温度 37℃, 调节波长为 405nm, 蒸馏水调零。

② 试剂一可提前于 37℃水浴锅中孵育 15min。

③ 在离心管 (EP 管) 中依次加入下列试剂:

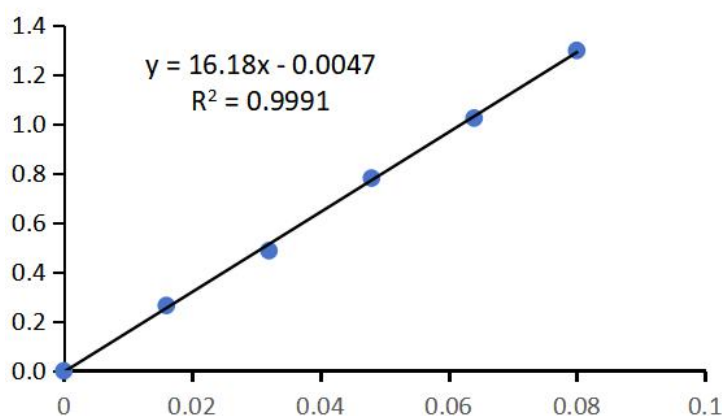
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
土壤	0.1g	0.1g
试剂一	1160	1160
试剂二	40	
蒸馏水		40
混匀, 37℃准确孵育 5min, 立即于室温条件下, 12000rpm 离心 5min, 取 900μL 上清液至 1mL 比色皿(光径 1cm)中, 于 405nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)。		

【注】: ① 若 ΔA 低于 0.01, 可增加样本量 W (如称取 0.2g); 或延长反应时间 T (如增至 10min 或更长后再离心读值), 则重新调整的 W 和 T 须代入公式重新计算。

② 若 ΔA 超过 1, 则需减少样本取样质量 (如称取 0.05g); 或减少反应时间 T (如减至 2min 后再离心读值), 则重新调整的 W 和 T 须代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y=16.18x-0.0047$, x 是 PNP 摩尔质量： μmol ; y 是 ΔA 。



2、定义：每克土壤每小时催化底物产生 $1\mu\text{mol}$ 的对硝基苯酚 (PNP) 为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{S-CA}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 土样}) &= [(\Delta A + 0.0047) \div 16.18] \div W \div T \\ &= 0.0124 \times (\Delta A + 0.0047) \div W \end{aligned}$$

W--- 样品质量，g；

T---反应时间，5min。

附：标准曲线制作过程（非必做项，可直接使用说明书公式计算结果）：

- 1 向标准品 EP 管里面加入 1.4mL 蒸馏水超声溶解，若有结晶析出，需 37°C 水浴至完全溶解。标准品母液浓度为 $10\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, $1.0\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。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 100uL，加入 900uL 蒸馏水，混匀得到 $1\mu\text{mol}/\text{mL}$ 的标品稀释液待用。						
标品浓度 $\mu\text{mol}/\text{mL}$	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2
标品稀释液 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	40	
蒸馏水		40
试剂一	1160	1160
混匀，在 37°C 下静置 5min，取 $900\mu\text{L}$ 上清液至 1mL 比色皿(光径 1cm)中立即于 405nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{0 浓度管}}$ 。		