

土壤碳酸酐酶 (S-CA)活性测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-TR077 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

碳酸酐酶 (Carbonic Anhydrase , CA , EC 4.2.1.1) 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 100mL×2 瓶 | 4°C 保存 | |
| 试剂二 | 粉剂 6 支 | 4°C 保存 | 每支: 1. 临用前甩几下或离心使粉体落入底部, 2. 每支分别加 1.5mL 无水乙醇混匀溶解, 混匀后可-20°C 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°C 保存 | 若重新做标曲, 则用到该试剂。 |

三、实验器材:

酶标仪、96 孔板、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 酶标仪预热 30 min , 设置温度 37°C , 调节波长为 405nm。

② 试剂一可提前于 37°C 水浴锅中孵育 15min。

③ 在离心管 (EP 管) 中依次加入下列样本和试剂:

| 试剂组分 (μ L) | 测定管 | 对照管 |
|-----------------|------|------|
| 土壤 | 0.1g | 0.1g |
| 试剂一 | 760 | 760 |
| 试剂二 | 40 | |
| 蒸馏水 | | 40 |

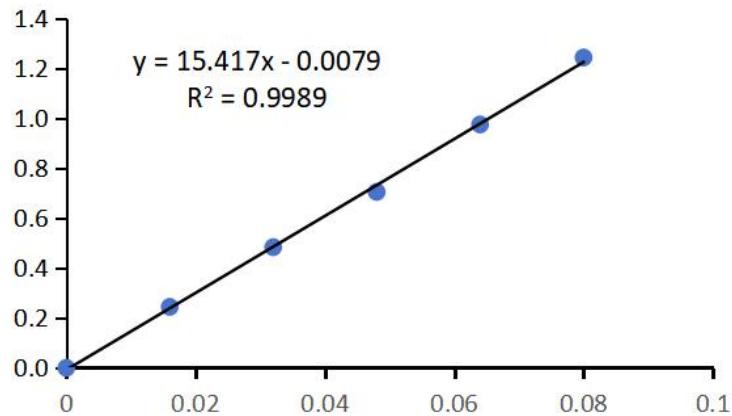
混匀, 37°C 准确孵育 5min, 立即于室温条件下, 12000rpm 离心 5min, 取 200 μ L 上清液至 96 孔板中, 于 405nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)。

【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： $y = 15.417x - 0.0079$ ，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。

$$\begin{aligned} S\text{-CA}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 土样}) &= [(\Delta A + 0.0079) \div 15.417] \div W \div T \div D \\ &= 0.013 \times (\Delta A + 0.0079) \div W \div D \end{aligned}$$

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, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, $2.0\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。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 200uL, 加入 800uL 蒸馏水, 混匀得到 $2\mu\text{mol}/\text{mL}$ 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 | 760 | 760 |
| 混匀, 在 37°C 下静置 5min, 取 200 μL 上清液至 96 孔板中, 立即于 405nm 下读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{0\text{ 浓度管}}$ 。 | | |

