

## 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 ( $\text{Zn}^{2+}$ ) 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℃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, 2. 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:

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℃, 调节波长为 405nm。

② 试剂一可提前于 37℃水浴锅中孵育 15min。

③ 在离心管 (EP 管) 中依次加入下列样本和试剂:

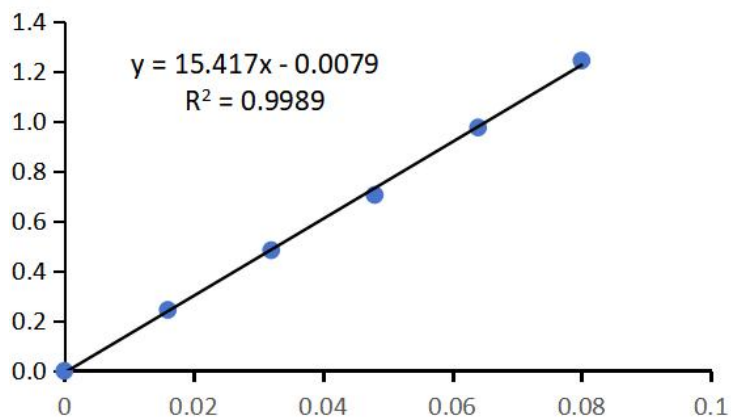
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
土壤	0.1g	0.1g
试剂一	760	760
试剂二	40	
蒸馏水		40
混匀, 37℃准确孵育 5min, 立即于室温条件下, 12000rpm 离心 5min, 取 200μL 上清液至 96 孔板中, 于 405nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)。		

【注】: ① 若  $\Delta A$  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  $\Delta A$  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： $\mu\text{mol}$ ； $y$  是  $\Delta A$ 。



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。

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

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  $37^\circ\text{C}$  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 ( $\mu\text{L}$ )	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 $37^\circ\text{C}$ 下静置 5min，取 $200\mu\text{L}$ 上清液至 96 孔板中，立即于 $405\text{nm}$ 下读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{0 浓度管}}$ 。		

