

# 土壤中性蛋白酶（S-NPT）试剂盒说明书

（微板法 48 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 12mL 试剂一搅拌至溶解，最后再加试剂一定容至 30mL，继续搅拌至全部溶解（约 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 60mL×1 瓶	4℃ 保存	用前摇匀
试剂五	液体 35mL×1 瓶	4℃ 保存	用前摇匀
试剂六	液体 12.5mL×1 棕色瓶	4℃ 保存	现用现配，临用前加 25mL 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：

酶标仪、96 孔板、水浴锅、磁力搅拌器、可调式移液枪、蒸馏水

## 四、土壤中性蛋白酶（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，再过 60 目筛网，备用。

### 2、上机检测：

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：

试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）	测定管	对照管
土样（g）	0.15g 鲜土 或 0.1g 干土	0.15g 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：

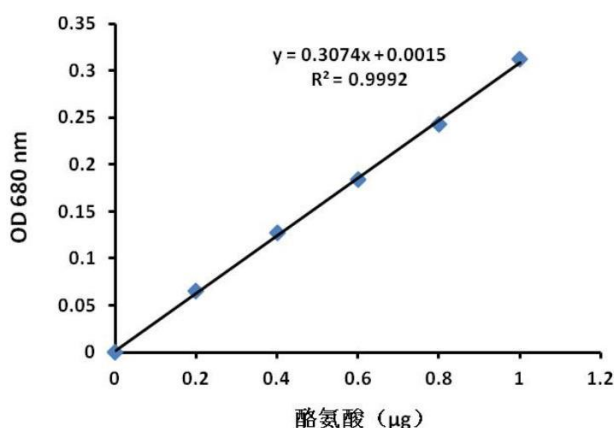
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
上清液	200	200
试剂五	300	300
试剂六	200	200

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

【注】：若  $\Delta A$  的值在零附近徘徊，可以加样土样取样量（如两倍的土壤质量）。

## 五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.3074x + 0.0015$ ，x 是标准品质量 (μg)，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。

$$\begin{aligned} \text{土壤中性蛋白酶 (S-NPT)} (\mu\text{g/h/g 鲜土}) &= (\Delta A - 0.0015) \div 0.3074 \div (W_1 \times V_1 \div V_2) \div T \\ &= 48.8 \times (\Delta A - 0.0015) \div W_1 \end{aligned}$$

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。

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。

$$\begin{aligned} \text{土壤中性蛋白酶 (S-NPT)} (\mu\text{g/h/g 干土}) &= (\Delta A - 0.0015) \div 0.3074 \div (W_2 \times V_1 \div V_2) \div T \\ &= 48.8 \times (\Delta A - 0.0015) \div W_2 \end{aligned}$$

V1----显色反应步骤中加入的上清液体积，50μL = 0.05mL；

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。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液 (100μg/mL)：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）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 4, 8, 12, 16, 20. μg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的显色反应阶段加样表依次加样，根据结果即可制作标准曲线。