

土壤酸性蛋白酶（Solid-Acid Protease, S-ACPT）试剂盒说明书

微量法 100管/48样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

土壤蛋白酶参与土壤中存在的氨基酸、蛋白质以及其他含蛋白质氮的有机化合物的转化，其水解产物是高等植物的氮源之一。S-ACPT在酸性环境下催化蛋白质水解，与土壤有机质含量、氮素及其他土壤性质有关。

测定原理：

酸性条件下，S-ACPT可将酪蛋白水解产生酪氨酸；在碱性条件下，酪氨酸还原磷钼酸化合物生成钨蓝；在680nm有特征吸收峰。

所需仪器及设备：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、磁力搅拌器、可调式移液枪、微量石英比色皿/96孔板、双蒸水

试剂组成和配置：

液体一：1mL×1支，4°C保存。

液体二：0.5mL×1支，4°C保存。

试剂一的配制：临用前按液体一：液体二：蒸馏水=140（ μ L）：20（ μ L）：21（mL）的比例配制，现配现用，如出现白色絮状沉淀则不能用。

试剂二：粉剂×1瓶，4°C保存；临用前加入6ml蒸馏水充分溶解；用不完的试剂4°C保存；

试剂三：粉剂×1瓶，4°C保存；临用前加入2mL试剂七，沸水浴加热溶解，然后加入8ml试剂一，充分混匀备用，用不完的试剂4°C保存；

试剂四：粉剂×1瓶，4°C保存；临用前加入30ml蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂4°C保存；

试剂五：液体8mL×1瓶，4°C保存；

试剂六：液体1.5mL×1支，0.05mg/ml标准酪氨酸溶液，4°C保存；

试剂七：液体5mL×1支，4°C保存；

样品处理：

新鲜土样自然风干或37度烘箱风干，过30~50目筛。

测定操作：

1. 试剂一的配制：见试剂的组成和配制。
- 2、分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至680nm，蒸馏水调零。
- 3、样本测定：

试剂名称	测定管	对照管
风干土样（g）	0.02	0.02
试剂一（ μ L）		150

试剂三 (μL)	150	
----------	-----	--

混匀，40°C水浴30min，振荡5-6次，使土样与反应液充分接触

试剂二 (μL)	50	50
----------	----	----

混匀，8000g 25°C离心10min，取上清液，在EP管或96孔板中加入下列试剂

	测定管	对照管	标准管
上清液 (μL)	60	60	
试剂六 (μL)			60
试剂四 (μL)	280	280	280
试剂五 (μL)	60	60	60

混匀，40°C水浴20min，8000g 25°C离心10min，取上清液200μL，680nm下读取各管吸光值A

注意：标准管只需测一次。每个测定管设一个对照管。

S-ACPT活性计算：

单位定义：每天每g土样中产生1mg酪氨酸为一个 S-ACPT活力单位。

$S-ACPT(mg/d/g土样) = C_{标准} \times (A_{测定管} - A_{对照管}) \div A_{标准管} \times V_{反总} \div W \div T = 24 \times (A_{测定管} - A_{对照管}) \div A_{标准管}$

C标准管：标准管浓度，0.05mg/mL；V反总：反应体系总体积，0.2mL；T：反应时间，30min=1/48d；W：样本质量，0.02g。