

土壤碱性蛋白酶（Solid - Alcalase Protease, S-ALPT）

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-ALPT在碱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：

碱性条件下，S-ALPT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。

实验中所需仪器及设备：

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：

试剂一：液体20mL×1瓶，4℃保存；

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

试剂三：粉剂×1瓶，4℃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℃保存；

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

试剂五：液体8mL×1瓶，4℃保存；

试剂六：液体1.5mL×1支，0.05mg/ml标准酪氨酸溶液，4℃保存；

试剂七：液体5mL×1瓶，4℃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、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。

2、试剂二、三和四40℃水浴10min。

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（ μ L） | 150 | |

混匀后，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-ALPT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-ALPT活力单位。

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

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。