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

（货号：G0316F 分光法 24 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。

土壤酸性蛋白酶（S-ACPT）在酸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 30mL×1 瓶	4℃保存	用前摇匀
试剂五	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	用前摇匀
试剂六	液体 5mL×1 棕色瓶	4℃保存	现用现配，临用前加 10mL 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：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、水浴锅、磁力搅拌器、可调式移液枪

四、土壤酸性蛋白酶（S-ACPT）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 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 680nm，蒸馏水调零。

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（μL）	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

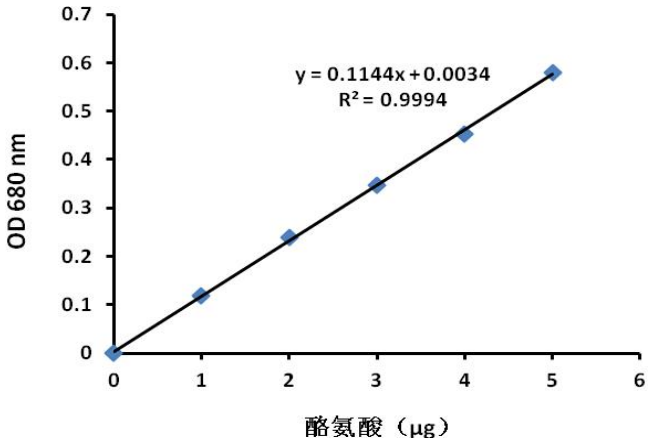
④ 显色反应：在 EP 管中依次加入：

上清液	250	250
试剂五	375	375
试剂六	250	250
室温静置 20min（若仍浑浊，可以延长静置时间至 30min 或 1700rpm 离心 10min），取全部上清液于 1mL 玻璃比色皿中，于 680nm 读取吸光值 A，△A=A 测定管-A 对照管		

【注】：若△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 = 0.1144x + 0.0034，x 是标准品质量（μg），y 是ΔA。



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。

土壤酸性蛋白酶（S-ACPT）(μg/h/g 鲜土)=(ΔA-0.0034)÷0.1144÷（W1×V1÷V2）÷T

=26.2×(ΔA -0.0034) ÷W1

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。

土壤酸性蛋白酶（S-ACPT）(μg/h/g 干土)= (ΔA -0.0034)÷0.1144÷（W2×V1÷V2）÷T

=26.2×(ΔA -0.0034) ÷W2

V1----显色反应步骤中加入的上清液体积，250μL =0.25mL；

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。