

土壤碳酸酐酶（S-CA）活性测定试剂盒说明书

（货号：G0354F24 分光法 24 样）

一、产品简介：

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（ 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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 mg×2 支	4℃保存	临用前甩几下或离心使粉体落入底部，每支分别加 1.1mL 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	粉体 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

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）、台式离心机、可调式移液器、水浴锅、恒温培养箱研钵、蒸馏水、无水乙醇。

四、土壤碳酸酐酶（S-CA）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品和实验流程，避免样本和试剂浪费！

1、样本的制备：

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、上机检测：

① 分光光度计预热 30 min，设置温度 37℃，调节波长为 405nm，蒸馏水调零。

② 试剂一可提前于 37℃水浴锅中孵育 15-30min。

③ 在 EP 管中依次加入下列试剂：

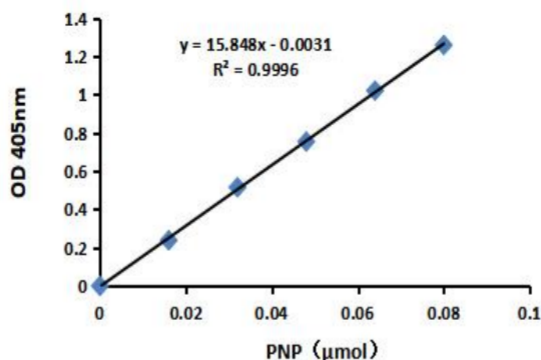
试剂名称（μL）	测定管	对照管
土壤（g）	0.1g	0.1g
试剂一	1160	1160
试剂二	40	
蒸馏水		40
混匀，37℃孵育 5min（精确）后，立即于室温条件下，12000rpm 离心 5min，取 800μL 上清液至 1mL 比色皿（光径 1cm）中，于 405nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

【注】：① 若 ΔA 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 ΔA 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： $y = 15.848x - 0.0031$ ，x 是 PNP 摩尔质量： μmol ；y 是 ΔA 。



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。

$$\begin{aligned} \text{S-CA}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 土样}) &= [(\Delta A + 0.0031) \div 15.848] \div W \div T \\ &= 0.013 \times (\Delta A + 0.0031) \div W \end{aligned}$$

W---样品质量，g；

T---反应时间，5min。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（ $10\mu\text{mol}/\text{mL}$ ）：向标准品 EP 管里面加入 1.4mL 无水乙醇超声溶解，若有结晶析出，需 37°C 水浴至完全溶解。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 按照 $40\mu\text{L}$ 的各个浓度标准品+1160 μL 试剂一，混匀 5min 后取 $800\mu\text{L}$ 至 1mL 比色皿（光径 1cm）中，于 405nm 处读值，根据结果即可制作标准曲线。