

## 土壤碳酸酐酶（S-CA）活性测定试剂盒说明书

（货号：G0354W48 微板法 48 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 100mL×1 瓶 | 4°C保存 |  |
| 试剂二  | 粉体 mg×3 支    | 4°C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°C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°C保存 | 若重新做标曲，则用到该试剂。   |

### 三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、低温离心机、恒温培养箱、可调式移液器、研钵、蒸馏水、水浴锅、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：

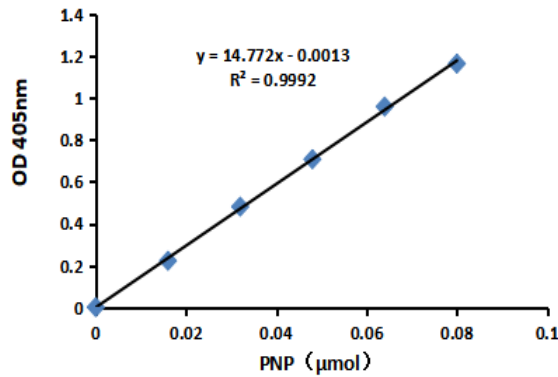
- ① 酶标仪预热 30 min，设置温度 37°C，调节波长为 405nm。
- ② 试剂一可提前于 37°C 水浴锅中孵育 15-30min。
- ③ 在 EP 管中依次加入下列试剂：

| 试剂名称(μL) | 测定管  | 对照管  |
|----------|------|------|
| 土壤 (g)   | 0.1g | 0.1g |
| 试剂一      | 760  | 760  |
| 试剂二      | 40   |      |
| 蒸馏水      |      | 40   |

混匀，37°C 孵育 5min（精确）后，立即于室温条件下，12000rpm 离心 5min，取 200μL 上清液至 96 孔板中，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）。

## 五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 14.772x - 0.0013$ ，x 是 PNP 摩尔质量： $\mu\text{mol}$ ；y 是  $\Delta A$ 。



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。

$$\begin{aligned} \text{S-CA}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 土样}) &= [(\Delta A + 0.0013) \div 14.772] \div W \div T \\ &= 0.014 \times (\Delta A + 0.0013) \div W \end{aligned}$$

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  $37^\circ\text{C}$  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+ $760\mu\text{L}$  试剂一，混匀 5min 后于 405nm 处读值，根据结果即可制作标准曲线。