

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 (μL) | | 150 |
| 试剂三 (μL) | 150 | |

混匀后, 40℃ 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℃ 离心 10min, 取上清液, 在 EP 管加入下列试剂

| | 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℃水浴 20min, 8000g 25℃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。

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

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。