

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

注 意：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℃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。