CheKine™ 土壤酸性蛋白酶（S-ACPT）活性检测试剂盒（微量法）

货号: KTB4024　　规格: 48 T/48 S　96 T/96 S　　批号：见产品标签

	适用样本：土壤
	保质期：4℃，避光保存 6 个月

01 背景与原理

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。土壤酸性蛋白酶在酸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。

本试剂盒检测原理是在酸性条件下，土壤酸性蛋白酶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 680 nm 有特征吸收峰。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Liquid Ⅰ	1 mL	2 mL	4℃，避光保存
Liquid Ⅱ	0.5 mL	1 mL	4℃，避光保存
Reagent Ⅱ	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃，避光保存
Reagent Ⅲ	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃，避光保存
Reagent Ⅳ	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃
Reagent Ⅴ	7.5 mL	15 mL	4℃，避光保存
Reagent Ⅵ	2.5 mL	5 mL	4℃
Standard	1 mL	1 mL	4℃，避光保存

***请在实验前检查各组分的量。**

***各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。**

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 680 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	去离子水	检测体系配制/试剂配制用
其他	水浴锅、烘箱、离心机、30-50 目筛、磁力搅拌器、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- **正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。**
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，**请在实验全程做好生物安全防护**，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Working Reagent Ⅰ	临用前配制；按 Liquid Ⅰ：Liquid Ⅱ：去离子水=90（μL）：20（μL）：21（mL）的比例配制	现配现用；出现白色絮状沉淀则不能用
Working Reagent Ⅱ	临用前配制；48 T 加入 6 mL 去离子水，96 T 加入 12 mL 去离子水，充分溶解	未用完的试剂 4℃避光可保存 1 个月；**Reagent Ⅱ有刺激性气味，建议在通风橱进行实验**
Working Reagent Ⅲ	临用前配制；48 T 加入 2 mL Reagent Ⅵ，96 T 加入 4 mL Reagent Ⅵ，沸水浴中磁力搅拌溶解（可在烧杯上盖一层保鲜膜，注意观察，避免水分全部蒸发，一般加热 15-30 min，该试剂为过饱和试剂，充分混匀后仍出现颗粒物不溶物不影响使用），然后 48 T 再加入 8 mL Working Reagent Ⅰ，96 T 再加入 16 mL Working Reagent Ⅰ，充分混匀待用	未用完的试剂 4℃避光可保存 1 个月
Working Reagent Ⅳ	临用前配制；48 T 加入 35 mL 去离子水，96 T 加入 70 mL 去离子水，充分溶解	未用完的试剂 4℃避光可保存 1 个月
Reagent Ⅴ	即用型；使用前，平衡到室温	4℃避光保存；**Reagent Ⅴ有毒，建议在通风橱进行实验**
Reagent Ⅵ	即用型；使用前，平衡到室温	4℃保存
Standard	即用型；20 μmol/mL 酪氨酸；使用前，平衡到室温	4℃避光保存
0.4 μmol/mL Standard	临用前配制；取 20 μL Standard，加入 980 μL 去离子水，充分混匀，配制成 0.4 μmol/mL Standard	每次实验都需要制备 0.4 μmol/mL Standard，稀释后的 0.4 μmol/mL Standard 需在 4 h 内使用完

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本。

- **土壤样本：**新鲜土样自然风干或 37℃烘箱风干，过 30-50 目筛。

05-3 实验步骤

1. **酶标仪准备**：预热 30 min 以上，调节波长到 680 nm。

2. **检测体系配制**：空白管和标准管只需做 1 次，每个测定管均需设置一个对照管。在 1.5 mL EP 管中按照如下方式操作：

试剂	测定管	对照管	标准管	空白管
样本（g）	0.04	0.04		
Working Reagent Ⅰ（μL）	0	150		
Working Reagent Ⅲ（μL）	150	0		
混匀后，置于 37℃培养箱中反应 24 h，期间振荡 5-6 次，使土样与反应液充分接触				
Working Reagent Ⅱ（μL）	50	50		
混匀后，8000 g，25℃离心 10 min，取上清。下述操作在新的 1.5 mL EP 管中				
上清液（μL）	60	60	0	0
0.4 μmol/mL Standard（μL）	0	0	60	0
去离子水（μL）	0	0	0	60
Working Reagent Ⅳ（μL）	280	280	280	280
Reagent Ⅴ（μL）	60	60	60	60

3. **吸光度检测**：混匀后置于 40℃孵育 20 min，8000 g，25℃离心 10 min，取 200 μL 上清至 96 孔板中，记录 680 nm 处吸光值，测定孔记为 $A_{测定}$，对照孔记为 $A_{对照}$，标准孔记为 $A_{标准}$，空白孔记为 $A_{空白}$。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧**二维码**或访问官网[https://www.abbkine.cn] **>** 进入“**技术中心**”**>** 查找“**在线计算器**”**工具**。

06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{对照}$，$\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}$。

2. 样本 S-ACPT 活性计算

酶活单位定义：每天每 g 土样中产生 1 μmol 的酪氨酸为一个酶活力单位。

$S\text{-}ACPT(U/g)=C_{标准}\times\Delta A_{测定}\div\Delta A_{标准}\times V_{反总}\div W\div T=\mathbf{0.08\times\Delta A_{测定}\div\Delta A_{标准}\div W}$

$C_{标准}$：0.4 μmol/mL 标准酪氨酸溶液；$V_{反总}$：反应体系总体积，0.2 mL；W：样品质量，g；T：反应时间，24 h=1 d。

07 结果展示

示例-1: 取 0.04 g 土壤样本，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得：$A_{测定}$=0.524，$A_{对照}$=0.126，$A_{标准}$=0.618，$A_{空白}$=0.042；$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{对照}$=0.398，$\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}$=0.576。按样本质量计算得：S-ACPT(U/g)=0.08×$\Delta A_{测定}$÷$\Delta A_{标准}$÷W=1.38 U/g。

08 FAQ

- **检测得到的样本$\Delta A_{测定}$过高或者过低怎么办?**

如果$\Delta A_{测定}$小于 0.01,可适当加大样本量。如果$\Delta A_{测定}$大于 0.8，加入 Working Reagent Ⅱ后的上清可用去离子水进一步稀释，或减少提取用样本量，再重新进行测定。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB4012	CheKine™ 土壤硝态氮含量检测试剂盒（微量法）
KTB4014	CheKine™ 土壤速效磷含量检测试剂盒（微量法）
KTB4041	CheKine™ 土壤碱性磷酸酶（S-AKP/ALP）活性检测试剂盒（微量法）
KTB4050	CheKine™ 土壤过氧化氢酶（S-CAT）活性检测试剂盒（微量法）

CheKine™ 土壤酸性蛋白酶（S-ACPT）活性检测流程示意图

（Abbkine 货号 ： KTB4024）

样本处理



新鲜土样自然风干或37℃烘箱风干，过30-50目筛

体系配置





样本	0.04 g	样本	0.04 g
Working Reagent III	150 μL	Working Reagent I	150 μL

混匀后，置于37℃培养箱中反应24 h，期间振荡5-6次，使土样与反应液充分接触

Working Reagent II	50 μL
Working Reagent II	50 μL

混匀后，8000 g，25℃离心10 min，取上清。下述操作在新的1.5 mL EP管中

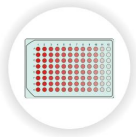




上清液	60 μL	上清液	60 μL	去离子水	60 μL	0.4 μmol/mL Standard	60 μL
Working Reagent IV	280 μL	Working Reagent IV	280 μL	Working Reagent IV	280 μL	Working Reagent IV	280 μL
Reagent V	60 μL	Reagent V	60 μL	Reagent V	60 μL	Reagent V	60 μL

混匀后置于40℃孵育20 min，8000 g，25℃离心10 min，取200 μL上清至96孔板中

数据检测



测定680nm的吸光度

结果计算

V1.0