

土壤碳酸酐酶 (S-CA) 活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号: AC17821

规格: 50T/24S

产品内容: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 75mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	粉剂×2 支	2-8°C保存
标准品	液体 1mL×1 支	2-8°C保存

溶液的配制:

- 1、试剂二: 临用前取一支试剂二, 先加入 1mL 丙酮使粉剂充分溶解, 再加入 10mL 蒸馏水。未用完的试剂分装保存, -20°C可以分装保存 1 周, 避免反复冻融。
- 2、标准品: 5 μ mol/mL 酚标准液。临用前取 50 μ L 的 5 μ mol/mL 酚标准液于试剂瓶中, 加入 750 μ L 蒸馏水充分混合, 配置成 0.3125 μ mol/mL 的酚标准液。

产品说明:

碳酸酐酶 (Carbonic Anhydrase, CA, EC4.2.1.1) 是一种以 Zn²⁺为活性中心的金属酶, 可用来高效催化 CO₂ 的可逆水合反应: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$, 催化速率可达自然条件下的 10⁷ 倍, 是目前已知催化速率最快的酶之一。

碳酸酐酶可催化乙酸对硝基苯酯反应生成对硝基苯酚, 通过检测 405nm 处吸光值上升速率反映碳酸酐酶活性。



注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、水浴锅/恒温培养箱、30-50 目筛、研钵、分析天平、台式离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、甲苯、蒸馏水和冰。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

新鲜土样自然风干或 37°C烘箱风干, 过 30~50 目筛。

二、测定步骤

- 1、可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 405nm, 蒸馏水调零。
- 2、试剂一使用前 37°C 预热 15min。
- 3、标准管测定

(1) 标准管测定: 在 2mL EP 管内中加入 320 μ L 标准液, 1180 μ L 试剂一, 充分混匀后, 于 1mL 玻璃比色皿中测定 405nm 处吸光值, 记作 A_{标准}。

(2) 标准空白管测定：在2mL EP管内中加入320μL蒸馏水，1180μL试剂一，充分混匀后，于1mL玻璃比色皿中测定405nm处吸光值，记作A_{标准空白}。

(3) 计算 $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{标准空白}$ 。（标准管和标准空白管只需做1-2次。）

4、操作表：（在 2mLEP 管内加入）

试剂名称（μL）	测定管	对照管
样本	0.2g	0.2g
甲苯	50	50
充分振荡使土壤呈潮湿状态，常温静置 15min		
试剂一	1130	1130
-	-	煮沸 10min，冰水冷却
试剂二	320	320
37°C反应 5min 后立即放入冰水浴中，之后 15000g，4°C离心 10min。吸取上清于 1mL 玻璃比色皿中测定 405nm 处吸光值，记作 A _{测定} ，A _{对照} 。计算 $\Delta A = A_{测定} - A_{对照}$ 。（每个测定管对应一个对照管）		

三、土壤 CA 活性计算

按样本质量计算

单位的定义：37°C，每g土壤每分钟催化产生1μmol 对硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$S\text{-CA活性 (U/g 质量)} = C_{标准} \times \Delta A \div \Delta A_{标准} \times V_{标准} \div W \div T \times F = 0.02 \times \Delta A \div \Delta A_{标准} \div W \times F$$

C_标：标准品浓度，0.3125μmol/mL；V_标：反应体系中加入的标准液体积，0.32mL；T：反应时间，5min；W：样本质量，g；F：样本稀释倍数。

注意事项：

- 1、如果 A 测定大于 1.5 或者 ΔA 大于 0.8，可以减少样本量或者缩短 37°C 酶促反应时间；ΔA 小于 0.02，可以加大样本量或者延长 37°C 酶促反应时间。注意计算时同步修改计算公式。
- 2、如果离心后待测的上清依然浑浊，可尝试加大离心转速或延长时间，例如 20000g，4°C 离心 10min。

实验实例：

1、称取 0.2014g 土壤样本 65 号，按照测定步骤操作，用 1mL 玻璃比色皿测得计算 $\Delta A = A_{测定} - A_{对照} = 0.595 - 0.400 = 0.195$ ，

$$\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{标准空白} = 0.448 - 0 = 0.448，带入公式计算：$$

$$S\text{-CA活性 (U/g 质量)} = 0.02 \times \Delta A \div \Delta A_{标准} \div W \times F = 0.043 \text{ U/g 质量}$$

2、称取 0.2015g 土壤样本 1 号，按照测定步骤操作，用 1mL 玻璃比色皿测得计算 $\Delta A = A_{测定} - A_{对照} = 0.275 - 0.137 = 0.138$ ，

$$\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{标准空白} = 0.448 - 0 = 0.448，带入公式计算：$$

$$S\text{-CA活性 (U/g 质量)} = 0.02 \times \Delta A \div \Delta A_{标准} \div W \times F = 0.031 \text{ U/g 质量}$$

参考文献：

[1] Li W, Yu L J, Yuan D X, et al. A study of the activity and ecological significance of carbonic anhydrase from soil and its microbes from different karst ecosystems of Southwest China[J]. Plant and Soil, 2005, 272(1):133-141.

相关系列产品：

AC10095/AC10096 土壤纤维素酶（S-CL）活性检测试剂盒