

土壤碳酸酐酶（S-CA）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：BC5505

规格：100T/48S

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 40mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×2 支	2-8℃保存
标准品	液体 1mL×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前取一支试剂二，先加入 650μL 丙酮使粉剂充分溶解，再加入 6.7mL 蒸馏水。未用完的试剂分装保存，-20℃可以分装保存 1 周，避免反复冻融。
- 2、标准品：5μmol/mL 酚标准液。临用前取 50μL 的 5μmol/mL 酚标准液于中，加入 750μL 蒸馏水充分混合，配置成 0.3125 μmol/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： $CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$ ，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/酶标仪、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、微量玻璃比色皿/96 孔板、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℃烘箱风干，过 30~50 目筛。

二、测定步骤

- 1、可见分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 405nm，可见分光光度计用蒸馏水调零。
- 2、试剂一使用前 37℃预热 15min。
- 3、标准管测定

- (1) 标准管测定：在 1.5mL EP 管内中加入 80μL 标准液，320μL 试剂一，充分混匀后，吸取 0.2mL 于微量玻璃比色皿/96 孔板中测定 405nm 处吸光值，记作 A_{标准}。

(2) 标准空白管测定：在1.5mLEP管内中加入80μL蒸馏水，320μL试剂一，充分混匀后，吸取0.2mL于微量玻璃比色皿/96孔板中测定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 1.5mLEP 管内加入）

试剂名称（μL）	测定管	对照管
样本	0.1g	0.1g
甲苯	20	20
充分振荡使土壤呈潮湿状态，常温静置 15min		
试剂一	300	300
		煮沸 10min，冰水冷却
试剂二	80	80
37°C反应 5min 后立即放入冰水浴中，之后 15000g，4°C离心 10min。吸取 0.2mL 于微量玻璃比色皿/96 孔板中测定 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组织每分钟催化产生1μmol 对硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$S\text{-CA活性 (U/g 质量)} = C_{标准} \times \Delta A \div \Delta A_{标准} \times V_{标准} \div W \div T \times F = 0.005 \times \Delta A \div \Delta A_{标准} \div W \times F$$

C_标：标准品浓度，0.3125μmol/mL；V_{标准}：反应体系中加入的标准液体积，0.08mL；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 0.1016g 土壤样本 16 号，按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算 $\Delta A = A_{测定} - A_{对照} = 0.353 - 0.227 = 0.126$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{标准空白} = 0.65 - 0.046 = 0.604$ ，带入公式计算：

$$S\text{-CA活性 (U/g 质量)} = 0.005 \times \Delta A \div \Delta A_{标准} \div W \times F = 0.010 \text{ U/g 质量}$$

2、称取 0.1056g 土壤样本 62 号，按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算 $\Delta A = A_{测定} - A_{对照} = 0.577 - 0.271 = 0.306$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{标准空白} = 0.65 - 0.046 = 0.604$ ，带入公式计算：

$$S\text{-CA活性 (U/g 质量)} = 0.005 \times \Delta A \div \Delta A_{标准} \div W \times F = 0.024 \text{ U/g 质量}$$

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：

BC0150/BC0155 土壤纤维素酶（S-CL）活性检测试剂盒

BC0160/BC0165 土壤 β-葡萄糖苷酶（S-β-GC）活性检测试剂盒