

土壤中性蛋白酶活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：AC10120

规格：100T/48S

产品组成：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 20 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	4°C保存
试剂三	粉剂×1 瓶	4°C保存
试剂四	液体 20 mL×1 瓶	4°C保存
试剂五	液体 5 mL×1 瓶	4°C保存
标准液	液体 1 mL×1 支	4°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 10 mL 试剂一，沸水浴搅拌溶解后待用；
- 2、试剂三：临用前加入 10 mL 蒸馏水充分溶解待用；
- 3、标准液：20 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 酪氨酸溶液。

产品说明：

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。土壤中性蛋白酶在中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。中性条件下，土壤中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680nm有特征吸收峰。

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。

需自备的仪器及用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液枪、恒温培养箱、微量玻璃比色皿/96孔板、蒸馏水、研钵、30-50目筛。

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、分光光度计/酶标仪预热30min 以上，调节波长至680nm，蒸馏水调零。
- 2、标准溶液的稀释：将20 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 酪氨酸标准液用蒸馏水稀释100倍至0.2 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 使用，现用现配。
- 3、样本测定：

试剂名称	测定管	对照管	标准管	空白管
风干土样 (g)	0.05	0.05	-	-
试剂一 (μL)	50	50	-	-
试剂二 (μL)	100		-	-
混匀后, 37°C反应24h, 期间振荡5-6 次, 使土样与反应液充分接触。			-	-
试剂三 (μL)	100	100	-	-
试剂二 (μL)	-	100	-	-
混匀, 10000rpm 室温离心10min, 取上清液			-	-
上清液 (μL)	44	44	-	-
标准液 (μL)	-	-	44	-
蒸馏水 (μL)	-	-	-	44
试剂四 (μL)	130	130	130	130
试剂五 (μL)	26	26	26	26
混匀, 40°C水浴 10min, 10000rpm 室温离心 10min, 取上清液于 680nm 下读取各管吸光值 A, 分别记为 A 测定管、A 对照管、A 标准管、A 空白管, 计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定管} - A_{对照管}$, $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管}$ 。(标准管、空白管只需测 1-2 次, 每个测定管设一个对照管。)				

三、土壤中性蛋白酶活性计算

单位定义: 每天每g土样中产生1μmol酪氨酸为一个土壤中性蛋白酶活力单位。

土壤中性蛋白酶(U/g 土样)=C标准管×ΔA测定÷ΔA标准×V反总÷W÷T=0.05×ΔA测定÷ΔA标准÷W

C标准管: 标准管浓度, 0.2μmol/mL; V反总: 酶促反应总体积, 0.25mL; T: 反应时间, 1d; W: 样本质量, g。

注意事项:

当吸光值大于1.5时, 建议将上清液用蒸馏水稀释后进行测定, 计算时注意乘以稀释倍数。

实验实例:

1、分别取 2 份 0.05g 森林土样于 1.5mLEP 管中, 分别为对照管及测定管, 按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得 $\Delta A_{测定} = A_{测定管} - A_{对照管} = 0.582 - 0.355 = 0.227$, $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管} = 0.374 - 0.045 = 0.329$, 按土壤质量计算酶活得:

土壤中性蛋白酶(U/g 土样)= $0.05 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div W = 0.05 \times 0.227 \div 0.329 \div 0.05 = 0.69$ U/g 土样。

2、分别取 2 份 0.05g 三叶草土于 1.5mLEP 管中, 分别为对照管及测定管, 按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定管} - A_{对照管} = 0.23 - 0.177 = 0.053$, $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管} = 0.374 - 0.045 = 0.329$, 按土壤质量计算酶活得:

土壤中性蛋白酶(U/g 土样)= $0.05 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div W = 0.05 \times 0.053 \div 0.329 \div 0.05 = 0.1611$ U/g 土样。

相关发表文献:

[1] Manyun Zhang, Jun Wang, Shahla Hosseini Bai, et al. Evaluating the effects of phytoremediation with biochar additions on soil nitrogen mineralization enzymes and fungi. Environmental Science and Pollution Research. May 2018;(IF2.914)

[2] Zhang M, Wang W, Wang J, et al. Dynamics of biochemical properties associated with soil nitrogen mineralization following nitrification inhibitor and fungicide applications[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2017, 24(12): 11340-11348.