

## 土壤中蛋白酶活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

**注意：**本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC0270

规格：50T/24S

**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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

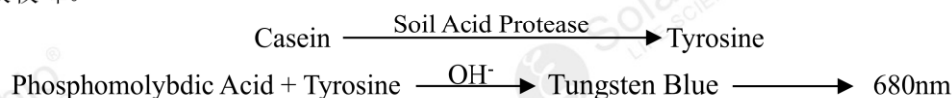
| 试剂名称 | 规格           | 保存条件   |
|------|--------------|--------|
| 试剂一  | 液体 20 mL×1 瓶 | 2-8℃保存 |
| 试剂二  | 粉剂×2 瓶       | 2-8℃保存 |
| 试剂三  | 液体 12 mL×1 瓶 | 2-8℃保存 |
| 试剂四  | 液体 40 mL×1 瓶 | 2-8℃保存 |
| 试剂五  | 液体 10 mL×1 瓶 | 2-8℃保存 |
| 标准液  | 液体 1 mL×1 支  | 2-8℃保存 |

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前取 1 瓶加入 6 mL 试剂一，沸水浴搅拌溶解后待用，用不完的试剂可以 2-8℃保存 4 周；
- 2、标准液：20μmol/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，酪氨酸还原磷钨酸化合物生成钨蓝，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。

**需自备的仪器和用品：**

可见分光光度计、可调式移液枪、台式离心机、水浴锅/恒温培养箱、1mL玻璃比色皿、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℃烘箱风干，过 30~50 目筛。

二、测定步骤

- 1、分光光度计预热30min以上，调节波长至680nm，蒸馏水调零。
- 2、标准溶液的稀释：取10μL 20μmol/mL酪氨酸标准液，加入990μL蒸馏水，充分混匀，配制成0.2μmol/mL标准液使用，现用现配。（实验中每管需要220μL，为减小实验误差，故配制大体积。）





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）                                                                                                                                                                       | 0.1 | 0.1 | -   | -   |
| 试剂一（μL）                                                                                                                                                                       | 100 | 100 | -   | -   |
| 试剂二（μL）                                                                                                                                                                       | 200 | -   | -   | -   |
| 充分混匀后，37℃水浴/恒温培养箱中反应24h，期间振荡5-6次，使土样与反应液充分接触。                                                                                                                                 |     |     | -   | -   |
| 试剂三（μL）                                                                                                                                                                       | 200 | 200 | -   | -   |
| 试剂二（μL）                                                                                                                                                                       | -   | 200 | -   | -   |
| 混匀，10000rpm 室温离心10min，取上清液待测。                                                                                                                                                 |     |     | -   | -   |
| 上清液（μL）                                                                                                                                                                       | 220 | 220 | -   | -   |
| 0.2μmol/mL标准液（μL）                                                                                                                                                             | -   | -   | 220 | -   |
| 蒸馏水（μL）                                                                                                                                                                       | -   | -   | -   | 220 |
| 试剂四（μL）                                                                                                                                                                       | 650 | 650 | 650 | 650 |
| 试剂五（μL）                                                                                                                                                                       | 130 | 130 | 130 | 130 |
| 充分混匀，40℃水浴或恒温培养箱培养 10min，10000rpm 室温离心 10min，取 1mL 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 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管，ΔA 标准=A 标准管-A 空白管。（标准管、空白管只需测 1-2 次，每个测定管需设一个对照管。） |     |     |     |     |

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。

土壤中性蛋白酶活性(U/g 土样)=C标准管×ΔA测定÷ΔA标准×V反总÷W÷T=0.1×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，0.5mL；T：反应时间，1d；W：样本质量，g。

注意事项

当吸光值大于1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、分别称取 2 份 0.1g 三叶草土于 1.5mL EP 管中，分别为对照管及测定管，按照测定步骤操作，使用 1mL 玻璃比色皿测定吸光度，计算 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管=0.320-0.218=0.102，ΔA 标准=A 标准管-A 空白管=0.540-0.028=0.512，按土壤质量计算酶活得：

土壤中性蛋白酶活性(U/g 土样)=0.1×ΔA 测定÷ΔA 标准÷W = 0.1×0.102÷0.512÷0.1=0.1992 U/g 土样。

2、分别称取 2 份 0.1g 林土于 1.5mLEP 管中，分别为对照管及测定管，按照测定步骤操作，使用 1mL 玻璃比色皿测定吸光度，计算 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管=0.195-0.135=0.06，ΔA 标准=A 标准管-A 空白管=0.540-0.028=0.512，按土壤质量计算酶活得：

土壤中性蛋白酶活性(U/g 土样)=0.1×ΔA 测定÷ΔA 标准÷W = 0.1×0.06÷0.512÷0.1=0.1172 U/g 土样。

相关发表文献：

- [1] Wang X, Wang Q, Li W, Zhang D, Fang W, Li Y, Wang Q, Cao A, Yan D. Long-term effects of chloropicrin fumigation on soil microbe recovery and growth promotion of *Panax notoginseng*. *Front Microbiol.* 2023 Jul 14;14:1225944. doi: 10.3389/fmicb.2023.1225944. PMID: 37520348; PMCID: PMC10375714.
- [2] Xiao J, Lan S, Farias ME, Qian L, Xia L, Song S, Wu L. The living forms of *Microcoleus vaginatus* and their





contributions to the aggregate structure of biocrusts. FEMS Microbiol Ecol. 2023 Apr 7;99(5):fiad040. doi: 10.1093/femsec/fiad040. PMID: 37028939.

- [3] 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)
- [4] 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.

#### 参考文献:

- [1] Huang X, Tian B, Niu Q. et al. An extracellular protease from *Brevibacillus laterosporus* G4 without parasporal crystals can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes[J]. Research in Microbiology, 2005, 156(5-6): 719-727.
- [2] Daniel Geisseler, William R Horwath. Regulation of extracellular protease activity in soil in response to different sources and concentrations of nitrogen and carbon [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2008, 40(12): 3040-3048.
- [3] Zhu W, Luan H, Bu Y. et al. Changes in taste substances during fermentation of fish sauce and the correlation with protease activity [J]. Food Research International, 2021, 144:110349.

#### 相关系列产品:

- BC0860/BC0865 土壤酸性蛋白酶活性检测试剂盒
- BC0880/BC0885 土壤碱性蛋白酶 (S-ALPT) 活性检测试剂盒
- BC0280/BC0285 土壤碱性磷酸酶 (S-AKP/ALP) 活性检测试剂盒
- BC0110/BC0115 土壤多酚氧化酶 (S-PPO) 活性检测试剂盒
- BC4040/BC4045 土壤中性转化酶 (S-NI) 活性检测试剂盒
- BC4030/BC4035 土壤  $\beta$ -1,4-葡聚糖酶 (S-C1) 活性检测试剂盒
- BC4010/BC4015 土壤  $\beta$ -木糖苷酶 (S- $\beta$ -XYS) 活性检测试剂盒

