

土壤中蛋白酶活性检测试剂盒说明书

微量法

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：BC0275

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。

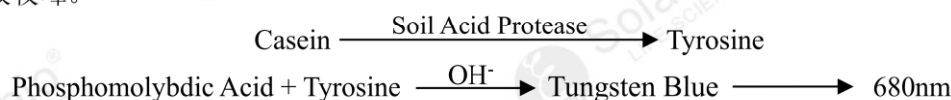
试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×2 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 12mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	液体 5 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准液	液体 1 mL×1 支	2-8℃保存

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：20 μmol/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。

需自备的仪器及用品：

可见分光光度计/酶标仪、可调式移液枪、台式离心机、水浴锅/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℃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，分光光度计用蒸馏水调零。
- 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44μL，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）	0.05	0.05	-	-
试剂一（μL）	50	50	-	-
试剂二（μL）	100	-	-	-
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）	100	100	-	-
试剂二（μL）	-	100	-	-
混匀，10000rpm 室温离心10min，取上清液待测。			-	-
上清液（μL）	44	44	-	-
0.2μmol/mL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
充分混匀，40℃水浴或恒温培养箱培养 10min，10000rpm 室温离心 10min，取 200μL 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=0.05×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、分别称取 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，使用 96 孔板测定吸光度，计算 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管=0.582-0.355=0.227，ΔA 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：

土壤中性蛋白酶活性(U/g 土样)=0.05×ΔA 测定÷ΔA 标准÷W=0.05×0.227÷0.329÷0.05=0.69 U/g 土样。

2、分别称取 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，使用 96 孔板测定吸光度，计算 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管=0.23-0.177=0.053，ΔA 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：

土壤中性蛋白酶活性(U/g 土样)=0.05×ΔA 测定÷ΔA 标准÷W=0.05×0.053÷0.329÷0.05=0.1611 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, Fariás 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;(1F2.914)
- [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 β -1,4-葡聚糖酶 (S-C1) 活性检测试剂盒
- BC4010/BC4015 土壤 β -木糖苷酶 (S- β -XYS) 活性检测试剂盒

