ICS 点击此处添加 ICS 号
CCS 点击此处添加 CCS 号

T/JAASS

团 体 标 准

T/JAASS XX—2022

土壤微生物胞外酶活的测定
荧光法

Determination of soil microbial extracellular enzyme activities–Fluorescence method

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX－XX－XX 发布 XXXX－XX－XX 实施

江苏省农学会 发 布

目　　次

前言 1
1 范围 1
2 规范性引用文件 1
3 术语和定义 1
4 原理 1
5 土壤采集和试剂配置 1
6 实验仪器 3
7 悬浊液制备 3
8 样品加样 3
9 样品培养 3
10 样品测定 3
11 结果计算 3

前　　言

本文件按照GGB/T 1.1–2009《标准化工作导则第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。
请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。
本文件由中华人民共和国农业部提出
本文件由江苏省农学会归口。
本文件起草单位：宁波大学
本文件主要起草人：祝贞科，葛体达

土壤微生物胞外酶活的测定——荧光法

1 范围

本文件规定了土壤微生物胞外酶活的测定。

本文件适用于具有荧光标记且荧光指示剂是4-甲基伞形酮（MUB）和7-氨基-4-甲基香豆素（AMC）底物酶的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

ISO 10381-6: 1993 土壤质量-采样-第6分：实验室中测定好氧微生物过程的土壤样品的采集、处理及贮存指南（ISO 10381-6: 1993,Soil quality-Sample-Part 6: Guidance on the collection, handing and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

β-葡糖苷酶（β-Glucosidase）：BG

β-木糖苷酶（β-Xylosidase）：XYL

β-乙酰葡糖胺糖苷酶（β-N-acetylglucosaminidase）：NAG

纤维二糖葡萄糖苷酶（B-D-cellobioside）：CBH

亮氨酸氨基肽酶（Leucine aminopeptidase）：LAP

磷酸酶（Alkline phosphatase）：PHOS

4 原理

解释土壤酶活性对于了解酶动力学和地下生态系统过程的动力学至关重要。由细菌和真菌产生的胞外酶（EEAs）参与无数的生物地球化学过程，是促进陆地生态系统养分循环的核心。

酶活性测量可以用摩尔浓度或活性表示。荧光酶测定使用来自产物的底物荧光的差异来测量酶反应。荧光是当吸收不同波长的光后分子发出一个波长的光。荧光酶测定的一般概念是将与荧光染料结合的合成底物加入到土壤样品中。当荧光染料通过酶催化反应从底物释放时，测量酶活性；而与较低荧光相比，较高的荧光指示更多的底物降解。常用的合成荧光指示剂是4-甲基伞形酮（MUB）和7-氨基-4-甲基香豆素（AMC）。

5 土壤采集和试剂配置

5.1 土壤样品采集及处理

应遵守土壤样品采集、处理及贮存指南（ISO 10381-6）。具体如下：在所选定的采样区域，采用五点取样法。先选取五个取样点，用剖面刀将取样点2-3 mm表土杂物刮去，然后用土钻垂直入土5-20 cm。

每个点的取土深度、质量应保持一致。随后将五个样点的土壤样品混匀并过2 mm筛子以除去石砾和植物残体，然后装入自封袋中密封；最后将所有采集的样品放在可移动冰箱中保存，或者放在装有冰袋的泡沫箱中，要尽快转运到实验室4°C冰箱，及时测定。

5.2. 试剂

使用公认的分析纯试剂，包括：

5.2.1 标准物 1：荧光指示剂是 4-甲基伞形酮（MUB）

1 mmol/L 的 4-Methylumbelliferone

将17.5 mg MUB溶于100 mL使用容量瓶中，用蒸馏水定容至100 mL。

注：可储存冷冻-20°C长达两个月，不要解冻后重新冻结

5.2.2 标准物 2：荧光指示剂 7-氨基-4-甲基香豆素（AMC)

1 mmol/L 的 7-Amino-4-methylcoumarin

将17.5 mg AMC溶于100 mL使用容量瓶中，用蒸馏水定容至100 mL。

注：可储存冷冻-20°C长达两个月，不要解冻后重新冻结

5.2.2 NaOH 溶液（1 M）

称取 NaOH 4 g，用无菌去离子水定容到 100 mL。

5.2.3 醋酸钠缓冲液（50 mM）

称取三水乙酸钠 6.804 g 于干净烧杯中，加灭菌水至 800 mL，用冰醋酸调节 pH 至 5.0，用无菌去离子水定容至 1 L。

5.2.4 50 mM Tris 缓冲液

将 6.057g Tris 碱（摩尔质量= 121.14g / mol）溶解在 900 mL 蒸馏水中，用浓 HCl 滴定至 pH = 8.2。

注：缓冲液应现配现用。.

5.2.5 不同底物溶液

BG：称取6.77 mg用无菌水定容至100 mL，棕色玻璃瓶保存
XYL：称取6.17 mg用无菌水定容至100 mL，棕色玻璃瓶保存
CBH：称取0.01 g溶于100 mL水，棕色玻璃瓶保存
NAG：称取7.59 mg用无菌水定容至100 mL，棕色玻璃瓶保存
LAP：称取6.5 mg溶于0.5 mL丙酮，用无菌水定容至100 mL（AMC），棕色玻璃瓶保存
PHOS：称取5.12 mg用无菌水定容至100 mL，棕色玻璃瓶保存

注：配好的标准物溶液可以4°C长期保存；配好的底物避光且4°C保存两周。

5.2.6 标准曲线制备

稀释标准储备溶液（MUB/AMC）（1 mM = 1000 μM）以产生标准曲线。从1:10稀释的原液开始创建一个100 μM溶液。从100 μM进行所有进一步的稀释。针对30 mL每个标准品进行测定。

1. 100 μM = 3 mL 1000 μM + 27 mL H_2O (1:10 dilution)
2. 50 μM = 15 mL 100 μM + 15 mL H_2O (1:2 dilution)
3. 25 μM = 15 mL 50 μM + 15 mL H_2O (1:2 dilution)
4. 10 μM = 12 mL 25 μM + 18 mL H_2O (1:10 dilution)
5. 5 μM = 15 mL 10 μM + 15 mL H_2O (1:2 dilution)

6. 2.5 μM = 15 mL 5 μM + 15 mL H_2O (1:2 dilution)
7. 0 μM = 15 mL H_2O

6 实验仪器

6.1 室温或恒温培养箱，温度（25 ± 2）℃。

6.2 乐扣盒

6.3 加液器

6.4 96 微孔板

6.5 移液枪

6.6 磁力搅拌器

6.7 酶标仪

7 悬浊液制备

用电子天平称取1.00 g新鲜土壤，放在已编号号码的乐扣盒中。用加液器加入125 mL灭菌冷却后的醋酸钠缓冲液，封口加盖，震荡2 h，180 r/min。另称取一份土壤测定土壤含水量。

8 样品加样

将乐扣盒放置在搅拌器上，一边搅拌一边加入200 μL土壤悬浊液到96微孔板中。将（8*12）的96微孔板分为两部分，前四列是样品孔（Substrate），后四列是空白孔（control），再取一个96微孔板将淬火样品（Reference standard）的7个浓度梯度溶液依次加入到相应的微孔板孔中。用移液枪在样品孔、空白孔、淬火孔分别加入每个土壤样品200 μL的土壤悬浊液。加入完成后分别在样品孔中加入每种酶与之对应的酶底物50 μL，空白孔中加入50 μL的缓冲液，在淬火孔中加入不同浓度的50 μL的标准物溶液。

此外，取另一个酶标板横分为两部分，前六列加入200 μL缓冲液和50 μL不同酶底物（Sample assay），做六个重复。后六列加入200 μL缓冲液和50 μL七个不同浓度的标准曲线溶液（Quench Standard）。

9 样品培养

全部加入完成，将微孔反应板置于20℃黑暗条件下培养4 h后，在每个孔加入10 μL 1 M的NaOH溶液使反应终止（记录时间，注：NaOH溶液不可提前注入等待上机，需注入一板立即读一板）。

10 样品测定

用纸巾擦净酶标板底部（去除凝结物防止影响读数），上酶标仪测定荧光值，激发波长365 nm，发射波长450 nm。经过负控制和淬灭校正后，酶活性单位是nmol h^{-1} g^{-1}。

11 结果计算

荧光活性(μmol h^{-1} g^{-1}) =（净荧光值/单位标准物的荧光值）/ (土壤干重×小时数)

单位标准物的荧光值= [Reference standard/(10 μmol/L × 0.00005 L)]；

土壤干重= (m/0.125 L) × 0.0002 L

净荧光值=[(Sample assay – Soil control) /Quench coefficient] – neg. control

土壤荧光抑制效应值（Quench coefficient）=[(Quench standard – Soil control) / Reference standard]

注：单位标准物的荧光值的目的是为了换算成为μmol 单位的数值。

参 考 文 献

[1]周礼恺, 张志明, 1980. 土壤酶活性的测定方法. 土壤通报, 37-38.

[2] 范淼珍, 尹昌, 范分良, 宋阿琳, 王伯仁, 李冬初, 梁永超, 2015. 长期不同施肥对红壤碳、氮、磷循环相关酶活性的影响. 应用生态学报 26, 833-838.

[3] 殷陶刚, 李玉泽, 2019. 土壤酶活性影响因素及测定方法的研究进展. 矿产勘查 10, 1523-1528.

[4]张丽莉, 武志杰, 陈利军, 李东坡, 马星竹, 史云峰, 2009. 微孔板荧光法对土壤糖酶活性的测定研究. 光谱学与光谱分析 29, 1341-1344.

[5] Acosta-Martínez, V., Klose, S., Zobeck, T.M., 2003. Enzyme activities in semiarid soils under conservation reserve program, native rangeland, and cropland. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 166, 699-707/

[6] Eivazi, F., Tabatabai, M.A., 1977. Phosphatases in soils. Soil Biology & Biochemistry 9, 167-172.

[7] Eivazi, F., Tabatabai, M.A., 1988. Glucosidases and galactosidases in soils. Soil Biology & Biochemistry 20, 601-606.

[8] Ge, T.D., Wei, X.M., Razavi, B.S., Zhu, Z.K., Hu, Y.J., Kuzyakov, Y., Jones, D.L.,Wu, J.S., 2017. Stability and dynamics of enzyme activity patterns in the rice rhizosphere: effects of plant growth and temperature. Soil Biology & Biochemistry 113:108–115.

[9] German, D.P., Weintraub, M.N., Grandy, A.S., Lauber, C.L., Rinkes, Z.L., Allison, S.D., 2011. Optimization of hydrolytic and oxidative enzyme methods for ecosystem studies. Soil Biology & Biochemistry 43, 1387–1397.

[10] Saiya-Cork, K.R., Sinsabaugh, R.L., Zak, D.R., 2002. The effects of long term nitrogen deposition on extracellular enzyme activity in an acer saccharum, forest soil. Soil Biology & Biochemistry 34, 1309–1315.

[11] Tabatabai, M.A., Bremner, J.M., 1969. Use of p-Nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. Soil Biology & Biochemistry 1, 301-307.