

《土壤微生物胞外酶活的测定 荧光法》(征求意见稿)

编制说明

一、目的意义

土壤酶是具有加速土壤生化反应速率功能的蛋白质,随着对土壤质量问题的重视,我国对土壤酶研究的深度和广度不断增加。土壤有机质是植物生态系统营养物质的源和库,对土壤有机质数量和质量的管理是进行植被恢复、促进植物健康生长以及实施生态系统管理的重要内容之一。土壤水解酶是催化土壤中各种底物发生水解反应的酶类,通过裂解有机化合物中糖苷键、脂键、肽键、酸酐键以及其他键,直接参与土壤中有机物的转化。

土壤水解酶的种类很多,主要涉及与有机碳、氮、磷和硫有关的酶类。与有机碳转化相关的酶主要有:(1)土壤纤维素酶,催化土壤中最重要碳水化合物即纤维素的水解。目前比较一致的观点是纤维素酶包括3类:一是内切1,4- β -葡聚糖苷酶(EC3.2.1.4),它随机地切割纤维素多糖链内部的无定型区,目前在土壤中的研究有限;二是外切葡聚糖酶(EC3.2.1.91),又称纤维二糖酶,它从纤维素多糖链的末端释放聚糖,目前已引起重视;三是 β -葡萄糖苷酶(EC3.2.1.21),是目前研究最广泛的一种土壤酶,它水解纤维二糖和其他水溶性的纤维糊精产生形成葡萄糖。(2)木聚糖酶(EC3.2.1.8),是一种参与植物残体半纤维素水解的重要酶[78],我国未开展相关的研究。(3)蔗糖酶又称转化酶(EC3.2.1.26),主要水解水溶性的蔗糖 β -D-呋喃果糖苷,产生葡萄糖和果糖。与有机氮转化相关的酶主要包括:(1)几丁质酶,与有机碳和氮的转化密切相关,在

土壤中目前研究较多的为 β -乙酰氨基葡萄糖苷酶(EC3.2.1.52)。(2)蛋白酶(EC3.4.21.24),它分解蛋白质、肽类为氨基酸。(3)肽酶,主要是氨基肽酶(EC3.4.11.1),从肽链的末端水解,形成氨基酸如亮氨酸和丙氨酸。(4)脲酶(EC3.5.1.5)研究的最多,其功能是水解尿素,生成CO₂和水。土壤中有机磷的转化主要依靠磷酸酶来完成,它水解磷酸脂类形成磷酸及其他产物。目前研究较多的是单酯磷酸酶,它又可分为酸性磷酸酶(EC3.1.3.2)和碱性磷酸酶(EC3.1.3.1)。

土壤酶测定方法是进行酶学研究的基础。在20世纪50年代,土壤酶测定方法的研究进入快速发展时期。经过60多年的发展,目前土壤酶的测定方法基本得到认可。但由于土壤酶牢牢地被矿物质胶体和腐殖质物质所吸附,目前直接提取土壤酶还存在很大的难度,通常是通过测定酶活性来了解土壤酶的丰缺状况。虽然目前土壤水解酶活性的测定方法还很不统一,但主要是根据一定量底物在酶催化反应过程中的生成物或剩余底物量间接测得的。基于这一测定原理的方法有两种:一是分光比色分析法。这是一种传统的测定方法,被国内外学者普遍采纳。其基本原理为水解酶与底物混合经培养后产生某种带颜色的生成物,并在某一吸收波长下产生特征吸收峰,最后用分光光度计测定生成物的含量;第二是荧光分析法,是20世纪90年代发展起来的。其主要原理是以荧光团标记底物作为探针,通过荧光强度的变化反映酶活性。与传统方法相比,荧光分析法具有培养时间短、高灵敏度(比分光光度法高2-3个数量级)、高选择性、试样量少等诸多优点。目前我国对土壤酶的研究日益关注,但在其研究过程中主要依据1986

年《土壤酶及其研究法》介绍的方法。

本文主要针对荧光分析法测定土壤胞外酶活性的方法进行说明和步骤规范，以便于该方法的规范化使用。

二、任务来源

说明项目来源文件。

(参考:根据~年~月~日江苏省农学会下达的关于征集~立项项目的通知(苏农学字[~]~号),标准牵头单位向江苏省农学会提交立项申请;根据~年~月~日江苏省农学会下达的关于~团体标准立项的公告(苏农学字[~]~号),批准本标准立项。

三、编制过程(需根据标准制定程序各阶段的进展不断补充,直到可发布为止)

1.研究现状

标准制定团队基于胞外酶测定基本方法原理,改进和优化了测试方法和步骤。分析了多个因素对土壤酶活的影响:(1)风干对土壤酶活性的影响,(2)低温保存对土壤酶活性的影响,(3)底物种类及其浓度对土壤酶活的影响,(4)土壤酶试验的培养条件(缓冲液、pH、培养温度、培养时间、抑制剂的使用)等。应用优化的土壤微生物胞外酶活测定荧光法,标准制定团队在农田、森林、荒地等酸性和碱性土壤中开展了土壤酶活性的测试分析。该方法方便、高效、测定数据稳定、可以广泛应用。

2.标准制定进展

3-6 月：形成《土壤微生物胞外酶活的测定（荧光法）》标准初稿；广泛吸收论证会专家意见后报省农产品质量安全学会申请立项；

7-9 月：调研论证修改完善标准初稿；

10-11 月：通过意见征求、审定等进一步完善标准内容；

12 月：标准报批。

按时间节点及工作进度简述编制过程。(主要叙述资料收集、分析调研、试验验证、综述报告、技术经济论证过程，草拟文本，征求意见,技术审查等过程。)

四、主要内容技术指标确立

1.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。

2.样品加样

将乐扣盒放置在搅拌器上，一边搅拌一边加入 200 μ L 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，后四列是空白孔，再取一个 96 微孔板将淬火样品的 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（Substrate）、空白孔（control）、淬火孔（Reference standard）分别加入每个土壤样品 200 μ L 的土壤悬浊液。加入完成后在样品孔中加入每种酶与之对应的酶底物 50 μ L，空白孔中加入 50 μ L 的缓冲液，在淬火孔中加入不同浓度的 50 μ L 的标准物溶液。

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）

3. 样品培养

全部加入完成，将微孔反应板置于 20°C 黑暗条件下培养 4 h 后，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）。

4. 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，酶活性结果用 nmol/h/g。

简述标准主要内容技术指标确定的依据，包括实地调研、查阅资料、试验论证等。

五、与相关法律法规和国家标准的关系

简述是否符合相关法律法规要求，技术指标高于国家标准相关技术要求。

六、实施推广建议

适用范围：适用于自然土壤和农田土壤中胞外酶活性测定。

土壤微生物胞外酶活的测定（荧光法）标准，相比于传统方法，具有培养时间短、高灵敏度（比分光光度法高 2-3 个数量级）、高选择性、试样量少等诸多优点。可以在多个生态系统的土壤酶活性测试中

应用，该方法标准的应用，可以方便、高效、准确的测定土壤酶活性、而且测定数据稳定，可以广泛应用。

七、团体标准涉及专利的说明

八、重大分歧意见的处理经过和依据

在标准编制过程中对重大分歧意见的处理情况说明。