

团体标准

T/ NAIA XXX-XXXX

土壤中蛋白酶的测定

Method for determination of the proteases in the soil

（征求意见稿）

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

宁夏化学分析测试协会 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1-2020 《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。

本文件由宁夏化学分析测试协会提出并归口。

本文件起草单位：宁夏回族自治区农业勘察设计院、宁夏中科精科检测技术有限公司、宁夏环境科学研究院（有限责任公司）。

本文件主要起草人：陈惠娟、吴秀玲、马晶、刘娜娜、周婷、冯婷婷、孙媛、崔安良。

本文件为首次发布。

土壤中蛋白酶的测定

1 范围

本文件规定了土壤中蛋白酶的测定方法，其中包括原理、试剂、仪器与设备、分析步骤、精密度。

本文件适用于土壤中蛋白酶的测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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。

GB/T 603 化学试剂 试验方法中所用制剂及制品的制备

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 土壤蛋白酶

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。它们的水解产物是高等植物的氮源之一。

4 原理

采用酵素为基质，利用土壤蛋白酶的酶促作用把蛋白质水解成肽，肽进一步水解为氨基酸。氨基酸与茚三酮共热反应，生成蓝紫色的络合物（特征颜色反应），其颜色深浅程度与氨基酸的含量成正比，用分光光度计测定氨基酸含量。并以氨基氮的含量来表示土壤蛋白酶的活性。

5 试剂

所用试剂和水，在没有注明其他要求时均为分析纯试剂和 GB/T 6682 中规定的二级水，所述溶液若未指明溶剂均系水溶液。试验中所需制剂及制品在没有注明其他要求时均按 GB/T 603 的规定制备。

5.1 1 % 酵素溶液（用 pH7.4 的 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液配制）：称取 10 g 酵素，加水溶解，并移入 1 L 的容量瓶中定容，摇匀备用。

5.2 磷酸氢二钠[c (Na₂HPO₄ · 7H₂O) =0.2 mol/L]溶液：称取 53.65 g 的磷酸氢二钠于 1000 mL 烧杯中，溶于水中，并移入 1 L 的容量瓶中定容，摇匀备用。

5.3 磷酸二氢钠[$c(\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}) = 0.2 \text{ mol/L}$]溶液:称取 27.80 g 的磷酸二氢钠于 1000 mL 烧杯中,加水溶解,并移入 1 L 的容量瓶中定容,摇匀备用。

5.4 pH7.4 的 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液:使用时,量取 19.0 mL (5.2) 溶液和 81.0 mL (5.3) 溶液,并将其混合即可。

5.5 2 %的茚三酮溶液(用丙酮配制):称取 2 g 的茚三酮,溶于丙酮中,用丙酮稀释至 100 mL。

5.6 甲苯

5.7 甘氨酸标准溶液:准确称取 0.1000 g 甘氨酸溶于水中,定容 1000 mL,即为 0.0200 mg/mL 氨基氮标准溶液。直接用 0.0200 mg/mL 的标准溶液做标准系列。

5.8 无水乙醇。

6 仪器与设备

6.1 恒温培养箱

6.2 离心机

6.3 水浴锅

6.4 可见分光光度计

7 分析步骤

7.1 试液制备

称取过 2 mm 孔径筛的风干土 4.00 g,置于 50 mL 的塑料离心管中,加 1 %酵素溶液 20 mL 和 1 mL 甲苯,旋紧瓶盖,摇匀后于 30 °C 的恒温培养箱中培养 24 h。培养结束后,取出,冷却。

过滤法:将培养液直接过滤,吸取 10 mL 滤液于另一支塑料离心管中,加入 20 mL 无水乙醇,摇匀,常温 10000 r/min 离心 5 min。离心液备用。

离心法:将培养液于 10000 r/min 离心 5min,吸取 5 mL 上清液,加入 20 mL 无水乙醇,摇匀,常温 10000 r/min 离心 5 min。离心液备用。

7.2 标准溶液的测定

分别准确吸取 0.0200 mg/mL 氨基氮标准溶液 0、0.20、0.50、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 mL 于 50 mL 具塞比色管中,即为 0.00、0.0040、0.0100、0.0200、0.0400、0.0600、0.0800、0.100 mg,加 1 mL 茚三酮溶液,用水补足至 5 mL,沸水浴 10 min,将比色管取出后,冷却,用水稀释至刻度。摇匀后于可见分光光度计 570 nm 处比色,以吸光度为纵坐标,氨基氮的质量为横坐标,并绘制校准曲线。

7.3 测定

准确吸取 7.1 所得离心液 2 mL 于 50 mL 具塞比色管中,以下同标准溶液的测定。

7.4 对照试验

每个土壤样品均做无基质对照，以除掉土壤中原来含有的氨基氮而引起的误差。整个试验要做无土壤对照，分析步骤同样品测定。

7.5 结果计算

土壤蛋白酶的活性，以培养24 h后1 g土壤中氨基氮的质量，用mg表示。按下列公式计算：

$$X = A \times D \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X —1 g土壤中氨基氮质量，mg；

A —试液中氨基氮质量，mg；

D —分取倍数；

重复试验结果以算数平均值表示，结果保留三位有效数字。

8 精密度

在重复性条件下，获得两次独立测定结果的相对偏差不得超过20%。
