

改良茚三酮比色法测定土壤蛋白酶活性的研究*

蔡红 沈仁芳

(土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008)

摘要 通过引入 Ca^{2+} 为蛋白酶激活剂、以 $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 和 $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4-\text{CH}_3\text{COOH}$ 混合试剂作为除杂剂、将抗坏血酸与 KIO_3 结合起来以提高茚三酮比色法测定氨基酸的灵敏度和稳定性, 并使培养和测定两个过程的 pH 缓冲体系有机结合起来, 从而全面改进了土壤蛋白酶活性的测定方法。用该方法测定了潮土、黄棕壤和红壤的蛋白酶活性, 并与常用的 Folin 比色法进行了试验比较, 证明该方法适合于测定中性、碱性土壤的蛋白酶活性并优于 Folin 比色法。

关键词 土壤蛋白酶; 茚三酮; 比色

中图分类号 S154.2 文献标识码 A

蛋白酶能够分解蛋白质、肽类为氨基酸, 参与调节生物的氮素代谢。在土壤中, 蛋白酶由于微生物活动、植物根系分泌和动植物残体的分解而富集起来, 成为土壤中的一种重要胞外酶, 该酶具有离体活性, 能够参与土壤的氮素循环。重金属、有机污染物和不良土壤 pH 都可以抑制土壤蛋白酶的活性, 因此, 蛋白酶活性可以反映土壤的环境质量状况。

1972 年, Ladd 和 Butler 提出了用酪素为底物, 以 pH8.1 的 tris-HCl 缓冲液培养土壤, 以三氯乙酸为蛋白质沉淀剂, 并采用 Lowry 等改进的 Folin 比色法测定土壤蛋白酶活性的方法^[1, 2], 此后不断有学者加以引用, 并有不同程度的修改, 例如, Dilly 和 Jean 将培养时间延长为 2 h^[3]; Marcote 等以及 Dilly 和 Nannipieri 在其他条件基本不变的情况下将对照改为培养后加入底物, 但缓冲液的 pH、沉淀剂种类和比色试剂等关键环节没有太大变化^[4, 5]; 而 Watanabe 和 Hayano 则改变底物为 benzyloxycarbonyl-L-leucine, 将培养温度降低为 30℃, 培养时间延长为 5 h, 测定方法改为茚三酮比色法^[6], 改变幅度较大, 但由于采用了茚三酮显色试剂而没有改变测定的缓冲条件, 我们在运用此方法时发现其测定结果可比性、重现性较差。

为了更准确地测定土壤蛋白酶活性, 我们在整合前人重要改进的基础上, 通过一系列试验, 确定了一

套自己的试验方法, 结果证明该方法测定土壤蛋白酶活性效果良好。

1 试验原理

在蛋白酶的作用下, 蛋白质水解可得到一系列中间产物, 最终生成 α -氨基酸^[7]:

蛋白质 \rightarrow 蛋白胍 \rightarrow 蛋白脲 \rightarrow 多肽 \rightarrow 二肽 \rightarrow α -氨基酸

将蛋白质加入含有蛋白酶的溶液里分解一段时间, 再测定生成的 α -氨基酸的含量, 可以反映蛋白酶的活性。

测定氨基酸含量最常用的办法之一是茚三酮比色法, 主要分为两个步骤: (1) 在微酸性环境下茚三酮与氨基酸发生氧化还原反应, 氨基酸被氧化为氨、二氧化碳和醛, 茚三酮则被还原; (2) 还原型茚三酮、氨和另一分子茚三酮进一步反应生成二酮茚-二酮茚胺的取代盐, 呈蓝紫色, 其最大吸光波长为 570nm, 颜色深度与氨基酸的含量呈正相关^[8]。

由于蛋白质分子本身含有氨基, 也能够参与显色反应, 因此必须首先除去蛋白质。可以通过加入适当的沉淀剂达到这一目的。另外, 反应液的 pH、杂质离子、反应时间及温度等都会对显色过程产生很大影响, 必须对待测液进行适当的预处理。

* 中国科学院“引进国外杰出人才”资助项目; 中国科学院知识创新工程项目(ISSASIP0203)

- 通讯作者, Tel: 025- 86881563; E-mail: rfshen@issas.ac.cn

作者简介: 蔡红(1978-), 男, 硕士研究生, 目前从事转基因植物根系分泌与根际生化特性研究

收稿日期: 2004- 06- 18; 收到修改稿日期: 2004- 09- 16

2 材料与方 法

2.1 供试土壤

碱性土壤,采用中国科学院封丘农业生态实验站玉米田 0~30 cm 表层土壤,土壤类型为潮土,自然风干后过 2 mm 筛,含水量为 2.13%。水土比为 5:1 时土壤 pH 为 9.30,1:1 时为 8.38。

中性土壤,采用南京郊区菜田表层 0~30 cm 土壤,土壤类型为黄棕壤,按照 1/1000 的比例加入少量 CaCO_3 ,在植物生长室内处理 68 d(温度为 25℃,空气相对湿度 65%,土壤保持湿润状态,培养过程中滋生了绿藻),鲜土过 2 mm 筛,含水量为 12.15%。水土比为 5:1 时土壤 pH 为 7.06,1:1 时为 6.69。

酸性土壤,采用中国科学院红壤生态实验站矮松林 0~30 cm 表层土壤,土壤类型为第四纪红粘土,自然风干后过 2 mm 筛,含水量为 6.76%。水土比为 5:1 时土壤 pH 为 5.13,1:1 时为 4.87。

2.2 试剂配制

pH7.6 的 0.05 mol L⁻¹ 的 tris-HCl 缓冲液(三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液):50 ml 0.2 mol L⁻¹ 的三羟甲基氨基甲烷与 27.5 ml 0.2 mol L⁻¹ 的盐酸混合,稀释成 200 ml。

酪酸钠的制备:将市售干酪素溶于 1% Na_2CO_3 溶液,并用醋酸使溶液酸化至 pH4.0,使蛋白质沉淀下来。用冷水将沉淀小心洗涤至中性,再用 1:1 的乙醇-乙醚混合物处理,在通风橱里风干^[9]。冷冻保存。

2% 酪酸钠溶液:称取 2g 酪酸钠,加入 10 ml 0.1 mol L⁻¹ 的 NaOH 溶液,沸水浴处理 5 min,待膨化后加入 pH7.6 的 tris-HCl 缓冲液约 80 ml,继续沸水浴处理,直至完全溶解,用同样的缓冲液定容至 100 ml。

Tris-HCl-CaCl₂ 混合溶液:用 pH7.6 的 0.05 mol L⁻¹ tris-HCl 缓冲液配制的 0.01 mol L⁻¹ 的 CaCl_2 溶液。

0.6 mol L⁻¹ 乙酸铅溶液。

草酸钠-乙酸混合溶液:每 1000 ml 0.26 mol L⁻¹ 的草酸钠溶液含有 240.7 ml 0.2 mol L⁻¹ 的乙酸。

茛三酮-乙醇-抗坏血酸混合试剂:称取 2 g 茛三酮,0.02 g 抗坏血酸,溶于 100 ml 无水乙醇。

0.2% KIO_3 溶液。

pH5.8 乙酸-乙酸钠缓冲液:94 ml 0.2 mol L⁻¹ 乙酸钠与 6 ml 0.2 mol L⁻¹ 乙酸混合。

0.01% 甘氨酸标准溶液:1 g 甘氨酸溶于 1000 ml 水,再稀释 10 倍。

甲苯。

以上试剂均为分析纯。

2.3 标准曲线的绘制

分别吸取 50、100、150、200、250、300 μl 0.01% 甘氨酸标准溶液,置于 10 ml 刻度试管中(浓度分别相当于 NH_2 0.107、0.213、0.320、0.426、0.533、0.639 $\mu\text{g ml}^{-1}$),加入 2 ml pH5.8 的乙酸-乙酸钠缓冲溶液,再加入 1.5 ml 茛三酮-乙醇-抗坏血酸混合试剂,混合均匀,沸水浴加热 16 min,取出立即用自来水冷却 15 min,加入 1 ml 0.2% KIO_3 并混合均匀,用蒸馏水定容至 10 ml,1 h 内在 570 nm 处比色测定吸光值(本次试验使用了 TU-1800 紫外可见分光光度计,北京普仪)。以氨基氮(NH_2)的浓度为横坐标,吸光值为纵坐标,绘制标准曲线。

2.4 培养与测定

称取 5g 土壤,加入 5 ml Tris-HCl-CaCl₂ 混合溶液和 1 ml 甲苯,混合均匀后静置 15 min 以抑制微生物活性,然后再加入 5 ml 2% 的酪酸钠溶液,50℃ 振荡培养 2 h。对照土壤在培养过程中不加酪酸钠溶液,但在培养结束后加入,且加入的酪酸钠也经历 50℃、2 h 的振荡培养过程。

培养结束并在对照中加入酪酸钠后,充分混合,置于 0~4℃ 冷藏柜中静置 30 min。取出加入 1.5 ml 0.6 mol L⁻¹ 乙酸铅溶液,17 000 g 离心 10 min,取上清液 1.5 ml,加入 457 μl 草酸钠-乙酸混合溶液,17 000 g 再离心 10 min,小心吸取 1 ml 上清液,按照绘制标准曲线的办法测定吸光值。

每个土样设置 3 个重复。

2.5 结果计算

$$\text{NH}_2(\mu\text{g}) = a \times 150$$

式中, a 为比色液吸光值在标准曲线上对应的浓度,单位为($\text{NH}_2 \mu\text{g ml}^{-1}$), 150 为换算为每个样品 NH_2 总含量的系数。

蛋白酶的活性以 50℃ 培养 2 h, 5 g 土壤中 NH_2 的 μg 数表示(为便于比较,也可以换算为 1 g 烘干土,表示为 $\text{NH}_2 \mu\text{g g}^{-1}$ 烘干土)。

3 结果与讨论

3.1 选择酪酸钠为酶促反应底物,以甘氨酸绘制标准曲线的依据

土壤中存在不同类型的蛋白酶,仅按照酸碱反

应类型就可以分为酸性、中性和碱性蛋白酶,各种蛋白酶最适作用底物也有区别,因此,为了反映土壤中多数蛋白酶的活性就应该选择一种通用底物。Bonmati 等认为蛋白酶对酪蛋白不具专一性^[10],邱秀宝等研究了一种碱性蛋白酶对 10 种天然蛋白的分解能力,发现其最适作用底物为酪蛋白^[11]。因此我们选用了酪酸钠作为酶促反应的底物,而以前的研究很不统一,很多采用了二肽、三肽等为底物,可能不太恰当。

邱秀宝等分析了酪蛋白的氨基酸组成,发现了 17 种氨基酸,且以非极性氨基酸为主,占总氨基酸的 41.4%,其中甘氨酸含量最高^[11]。另外,有研究认为不同氨基酸与茚三酮的显色反应会有所不同^[12],为减小试验误差,我们选用了甘氨酸作为标准氨基酸试剂,而前人的研究多以酪氨酸为标准,可能误差较大。

3.2 培养条件(pH、温度、时间和培养方式)的选择依据

不同的蛋白酶最适作用条件是不同的,如 Kamimura 和 Hayano 研究了酸性茶园土壤中蛋白酶最适作用条件,发现酶的活性有两个最佳 pH,分别为 pH4 和 pH9^[13];Ladd 研究了 Mount Gambier 土壤中的蛋白酶性质,发现 55℃ 和 pH 7.5 是其最适作用条件^[14];周平和于宏川研究了中性蛋白酶的最佳作用条件,发现 48℃ 和 pH7.0 酶活性最高^[15]。因此我们不可能兼顾所有蛋白酶的要求,而只能根据土壤情况把条件控制在多数蛋白酶的反应范围内。

工业发酵生产蛋白酶的实践表明,产酶的最佳条件也是酶活性最高的条件^[16],由此推断,中碱性土壤中应该会积累较多的中碱性蛋白酶,测定中碱性蛋白酶活性更能反映中碱性土壤蛋白酶的情况。由于我们使用的黄棕壤经 CaCO₃ 处理表现为中性(水土比 5:1 时 pH 为 7.1)而封丘潮土是一种碱性土壤(水土比 5:1 时 pH 达 9.3),所以我们拟定的培养目标是充分表达中碱性蛋白酶的活性,将 pH 控制在 8.0 左右应该会比较理想的选择。

由于 tris 缓冲液的最佳缓冲力正好处于中碱性范围,所以可以用来培养中碱性蛋白酶。我们的研究表明,当选用 pH7.6 的 tris 缓冲液时,5 g 黄棕壤的 10 ml 悬浊液的 pH 稳定在 7.8 左右,而 5 g 潮土的 pH 稳定在 8.1 左右。

培养温度和培养时间也很重要。低温有利于延长酶的作用时间,但酶活性较低,相反,适当提高反应温度可以提高酶的活性,但不利于酶的稳定

性^[15]。多数资料选择培养温度 50℃、培养时间 1~2 h 还是有道理的。本次试验我们采用了 50℃,培养 2 h。另外,为了使酶与底物充分接触,采用恒温振荡培养方式。

3.3 培养液中加入 CaCl₂ 的原因

大量研究表明,Ca²⁺ 对蛋白酶有明显的保护和稳定作用^[11,15,17]。没有 Ca²⁺ 存在时,灰色链霉菌中性蛋白酶只在 pH7~7.5 很狭窄的范围内稳定,当有 Ca²⁺ 存在时,稳定 pH 范围扩大到 5~9;在 Ca²⁺ 存在下,枯草杆菌中性蛋白酶在 pH5.5~10 可以稳定数小时,其反应最适温度可以提高到 57℃。一种真菌产生的碱性蛋白酶,在 Ca²⁺ 存在时,37℃ 时的半衰期由 7.5 min 延长到 165 min。有 Ca²⁺ 时半数以上碱性蛋白酶可在 65℃ 维持 15 min。50℃ 培养的耐热蛋白酶,在 Ca²⁺ 存在下 80℃ 加热 10 min,酶活性尚存 85%,无 Ca²⁺ 时 76℃ 经 10 min 酶活性即下降 50%^[16]。

为了提高土壤蛋白酶活性测定的灵敏度,我们选用 CaCl₂ 作为蛋白酶培养的稳定剂。Azereb 等的研究指出 10 mmol L⁻¹ 浓度的 Ca²⁺ 能够显著提高土壤蛋白酶的活性^[17],为了既能够保持酪蛋白的溶解状态,同时又可以充分发挥 Ca²⁺ 的激活作用,我们将培养液的 Ca²⁺ 浓度适当下调为 5 mmol L⁻¹。

3.4 土壤吸附作用对测定的影响及其消除、对照的设置

试验发现,酪酸钠与土壤混合培养后测定的吸光值,扣除同样条件下培养的无土壤酪酸钠的吸光值,结果为负值(见表 1)。但是,理论上土壤蛋白酶作用酪酸钠后会产生更多的氨基酸,应该会使测定值增加,为什么测定结果反而减少了呢?我们用标准甘氨酸研究了氨基酸在土壤中的行为:向 5 g 土壤中加入浓度由低到高系列浓度的甘氨酸标准液,并用甲苯抑制微生物的活性,30℃、24 h 后测定剩余 NH₂ 的量,求得了 NH₂ 的回收率。

表 1 土壤吸附对测定的影响

Table 1 Influence of soil adsorption on the assay

处理 Treatments	土壤+ 酪酸钠 Soils + sodium caseinate	酪酸钠 Sodium caseinate
吸光值 ¹⁾ Absorbance	0.386±0.002 ²⁾	0.441±0.006

1) 10 ml 1% 酪酸钠处理在 570 nm 处的吸光值 Absorbance at 570 nm treated with 10 ml 1% sodium caseinate; 2) 平均值±标准偏差 Mean±SD

结果表明,土壤对氨基酸存在很强的吸附性,但

其回收率随加入土壤的 NH_2 的量而增大,并逐渐趋于完全回收(图 1)。因此,可以通过适当加大酪酸钠的用量来提高氨基酸的回收率。我们设定培养液中酪酸钠的浓度为 1%,比 Ladd 和 Butler^[11]的稍高。

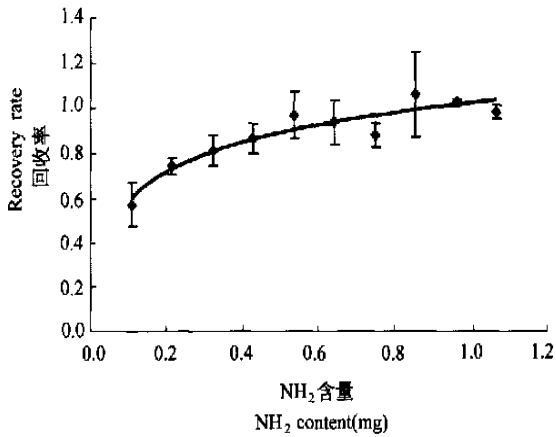


图 1 回收率与加入土壤的总 NH_2 的关系

Fig. 1 Correlation between recovery rate and total NH_2

另外,对氨基酸回收产生影响的还可能还有其他因素,如耐甲苯微生物的取食、与其他土壤成分的络合、在土壤活性物质催化下发生分解等。因此,必须设置对照来消除这些影响。Marcote 等、Dilly 和 Nannipieri 的对照处理是:培养前不加酪酸钠,但在培养后加入^[4,5]。但他们都没有将酪酸钠自身的变化考虑进去,也没有考虑氨基酸在土壤中的吸附与解吸平衡问题。本试验发现,在与土壤同等培养条件下,酪酸钠本身就存在很高的氨基酸本底值。因此本研究借鉴了他们的对照处理思路,即土壤培养后加入酪酸钠,但进行了适当修改,即本研究中加入的酪酸钠经历了与土壤一样的培养过程(50 °C 振荡方式培养 2 h),并将对照放置在 0~4 °C 的环境中平衡 30 min。

3.5 蛋白质沉淀剂的选择依据和用量

蛋白质对氨基酸的测定影响很大,本研究发现,蛋白质沉淀不彻底几乎完全掩盖了氨基酸的存在。因此,必须寻找合适的沉淀剂以消除过剩蛋白质对测定的影响。盐、重金属、生物碱、有机溶剂等可以通过打破蛋白质的电荷平衡、破坏其空间构象、脱去其表面水膜等机理导致蛋白质发生可逆或不可逆沉淀。

为了彻底清除蛋白质,最好的办法是使其发生不可逆沉淀。三氯乙酸是最常用的不可逆沉淀剂,沉淀效果很好,我们用它在多孔板上比较了乙醇、

Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Al^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Pb^{2+} 等的沉淀效果,发现除 Al^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Pb^{2+} 以外,其他离子及乙醇的沉淀效果都不够理想。但是,由于 Al^{3+} 和 Zn^{2+} 是两性离子,当溶液的酸碱条件变化时就会发生形态转变,且两者尤其是 Al^{3+} 很容易水解使溶液酸化,影响茚三酮的显色。而采用三氯乙酸作为沉淀剂,虽然沉淀效果很好,但它在溶液里呈强酸性反应,待测液的 pH 不易控制,且它在水浴过程中发生分解,生成有毒气体污染环境。因此我们考虑使用 Pb^{2+} 作为沉淀剂。

为了在沉淀过程中形成显色反应所需要的弱酸性缓冲环境,我们使用了乙酸铅试剂,并利用草酸钠沉淀 Pb^{2+} 。我们在草酸钠溶液里按照一定比例加入了乙酸溶液,这样,当沉淀完全后形成了 pH 5.8 的稳定的乙酸-乙酸钠缓冲溶液,显色反应呈蓝紫色,表明该缓冲溶液符合显色反应条件。

乙酸铅的用量不宜过多,否则蛋白质分子会形成新的电荷保护层而重新溶解。我们的试验表明,要将 10 ml 1% 酪酸钠溶液中的酪蛋白完全沉淀,0.6 mol L⁻¹ 乙酸铅溶液的最佳用量为 1.2 ml,且加入 1.5 ml 与加入 1.2 ml 没有明显区别。考虑到土壤对 Pb^{2+} 有很强的吸附性,且土壤中的 PO_4^{3-} 、 CO_3^{2-} 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} 等阴离子也能够与 Pb^{2+} 形成稳定的沉淀,因此土壤溶液中乙酸铅的最佳用量应该为 1.5 ml。

3.6 显色反应中 pH 的控制

茚三酮与氨基酸的显色反应宜在弱酸性环境中进行,最适 pH 范围为 4~7 或 5~7, pH 过低不显色,过高则形成其他非目标颜色^[12]。为了确定最佳显色 pH,研究中将 0.2 ml 1% 的甘氨酸标准溶液标定不同 pH,与 1 ml 茚三酮试剂反应后定容至 50 ml,测定其吸光值,结果如图 2 所示, pH 5.8 左右显色效

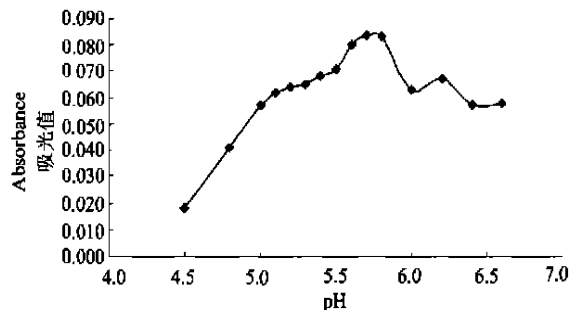


图 2 吸光值随 pH 的变化

Fig. 2 Effect of pH on absorbance

果最好。因此我们选用了在弱酸性范围内缓冲能力较强的乙酸-乙酸钠缓冲溶液,使显色反应体系的pH保持在5.8左右。

3.7 杂质离子对显色的影响及其清除

对显色产生负面影响的阳离子杂质主要为二价或二价以上的金属离子或单价重金属离子,如 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Al^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Fe^{3+} 等,可能会通过水解、氧化、络合等不同机理影响显色反应。我们的试验表明,当溶液中含有较多的上述离子时,显色很慢,甚至不显色。其中尤以 Zn^{2+} 、 Al^{3+} 最为明显,很可能是这两种两性离子的水解而导致pH过低的缘故。中碱性土壤活性 Al^{3+} 含量很低,不会对测定产生影响,但其他阳离子杂质必须首先从待测液中清除才能进行显色测定。

影响显色反应的阴离子主要有 HPO_4^{2-} 、 PO_4^{3-} 、 CO_3^{2-} 等,试验表明这些离子使反应液的颜色变为金黄色或紫红色,且光谱扫描表明这几种离子形成的颜色在可见光区没有吸收峰,但却存在很强的光吸收,从而掩盖了氨基与茚三酮反应的目标颜色蓝紫色。测定其pH,发现均在碱性范围,因此推测是由于这些离子属弱酸根离子,在水溶液中发生水解而导致pH增大形成碱性反应环境。在碱性条件下, α -氨基酸和茚三酮的反应主要按直接氧化还原的机理进行,主要的显色产物是双1,3-二酮茚,产物颜色为紫红色^[12],因此,这些阴离子也必须从待测液中清除。

为了清除上述杂质离子,我们选用了乙酸铅和

草酸钠作为沉淀剂,通过两步沉淀法,非常方便地达到了消除杂质的目的。其原理是, Pb^{2+} 能够沉淀蛋白质和多数负反应阴离子,而草酸钠能够与绝大多数金属离子产生稳定的沉淀^[18]。我们首先用 Pb^{2+} 沉淀过剩的蛋白质和阴离子,再用草酸钠将过剩的 Pb^{2+} 和其他阳离子一并除去,通过精确控制草酸钠的使用量,少量多余草酸钠不会对显色过程产生影响。

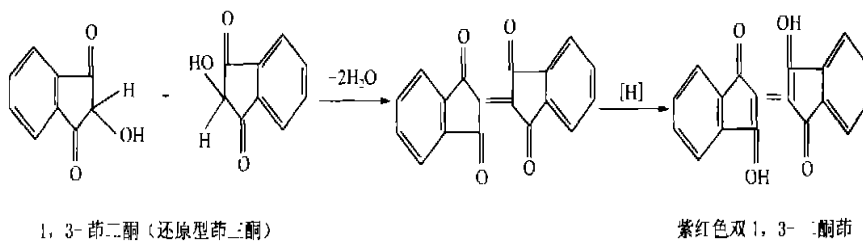
经过除杂处理后的土壤溶液呈无色清亮状态(未除杂则显淡黄色),显色反应为蓝紫色,效果令人满意。

3.8 茚三酮显色剂的配制和比色液的稳定化处理

有资料发现向茚三酮和氨基酸的反应体系中加入一定量的抗坏血酸可以提高反应的灵敏度^[19],还有人发现向反应后的比色液中加入 KIO_3 有利于保持颜色的稳定性^[20]。由于抗坏血酸是还原剂,而 KIO_3 是氧化剂,为什么性质截然相反的两种试剂均能够增强显色效果呢?

我们认为,当茚三酮过量时,加入还原剂抗坏血酸有利于形成更多的还原型茚三酮,从而加大了形成目标有色缩合物的电化学梯度,最终提高了显色的灵敏度。

但是,有色缩合物不是单一的,反应中间产物也可能通过其他形式的缩合形成各种结构的有色物质。例如,紫红色的双1,3-二酮茚就是通过还原的中间体1,3-茚二酮缩合后得到的有色产物^[12],如图:



因此,当目标反应终止以后,加入适量的 KIO_3 ,可以把反应液中过剩的还原型茚三酮氧化掉,减少副显色反应的发生,有利于保持目标颜色的稳定性。

基于上述分析,我们提出了如下设想:在显色反应前向反应体系中加入抗坏血酸以提高蓝紫色缩合物的产量;目标颜色形成后加入 KIO_3 除去过量还原性物质以保持比色液的稳定性。

我们在100 ml 2%茚三酮的乙醇溶液中加入了

0.02 g 抗坏血酸,并与不加抗坏血酸的茚三酮试剂进行了比较,发现加入抗坏血酸显色速度明显加快,形成的蓝紫色颜色较深(图3)。我们还比较了比色液中加入0.2% KIO_3 与不加入的区别,发现加入 KIO_3 后比色器的读数更加稳定,这与赵爱菊和马美范^[20]的研究结果一致。

3.9 改良茚三酮比色法与其他方法测定效果的比较

用关松荫等介绍的普通茚三酮比色法^[21]测定

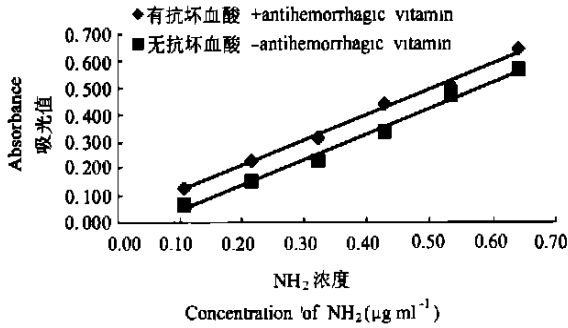


图3 抗坏血酸对吸光值的影响

Fig. 3 Effect of antihemorrhagic vitamin on absorbance

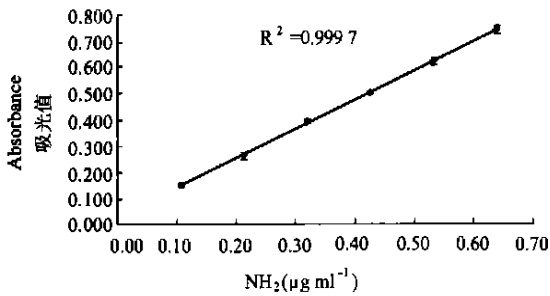


图4 甘氨酸标准曲线(改良的茚三酮比色法)

Fig. 4 Standard curve of Gly (Improved ninhydrin colorimetry)

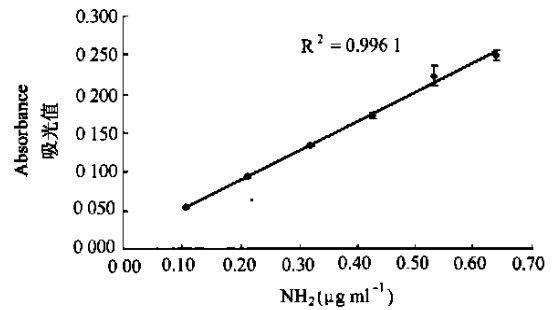


图5 酪氨酸标准曲线(Folin比色法)

Fig. 5 Standard curve of Tyr (Folin phenol colorimetry)

表2 Folin比色法和改良的茚三酮比色法测定土壤蛋白酶活性的比较

Table 2 Comparison between Folin phenol colorimetry and modified ninhydrin colorimetry in determination of soil protease activity

土壤类型 Soil type	Folin 比色法 Folin phenol colorimetry		改进后的茚三酮比色法 Modified ninhydrin colorimetry	
	蛋白酶活性 ¹⁾ Protease activity	变异系数 Coefficient of variation	蛋白酶活性 Protease activity	变异系数 Coefficient of variation
	江苏黄棕壤 Yellow-brown earth from Jiangsu Province	1.039 ± 0.225 ²⁾	0.216	7.635 ± 0.354
河南潮土 Fluvo-aquic soil from Henan Province	0.562 ± 0.014	0.025	2.810 ± 0.056	0.020
江西红壤 Red soil from Jiangxi Province	0.181 ± 0.341	0.490	-1.264 ± 0.140	0.111

1) 土壤蛋白酶活性表示为($\text{NH}_2, \mu\text{g g}^{-1}$) 烘干土 $50^\circ\text{C}2\text{h}^{-1}$ Soil protease activity is described as ($\text{NH}_2, \mu\text{g g}^{-1}$) DW soil $50^\circ\text{C}2\text{h}^{-1}$; 2) 平均值 ± 标准偏差 Mean ± SD

了黄棕壤蛋白酶的活性,发现3个重复的酶活性均为负值,分别为-191、-190、-197($\text{NH}_2 \mu\text{g g}^{-1}$ 烘干土),显然不符合土壤实际。因此将改良茚三酮比色法与经典的Ladd和Butler的Folin比色法^[1,2]进行了试验比较。

本方法测定的标准曲线见图4, Ladd法结合Lowry改进的Folin比色法测定的标准曲线见图5,土壤蛋白酶活性测定结果见表2。

从图4和图5可以看出两种比色方法绘制的标准曲线均呈良好线性,其中改进后的茚三酮比色法效果更好,相关性达到0.9997。

从表 2 可以看出,改进的茚三酮比色法测定结果比 Folin 比色法的测定结果变异性更小,说明我们的方法系统误差较小,因此稳定性更好。另外还可以看出,本方法反映的酶活性除红壤外均显著高于 Folin 比色法,表明本方法测定中、碱性土壤的蛋白酶活性灵敏度较高。

两种方法反映的土壤蛋白酶的活性总体趋势一致。蛋白酶活性以黄棕壤的最高,其次是封丘潮土。红壤蛋白酶活性很低,本方法未检测到红壤的蛋白酶活性,Ladd 法检测结果也很低,有负值出现。

必须指出,黄棕壤在植物生长室内培养了 68d,表层生长有绿藻,且测定的是鲜土,培养过程中 pH 处于本方法的 pH 范围内(稳定在 7.8 左右),因此蛋白酶的活性最高。潮土经历了风干过程,可能会导致酶活性有一定程度的下降,但培养过程中 pH 稳定在 8.1 左右,符合本试验条件,因此能够反映其蛋白酶活性。而红壤采自松林下的强酸性土壤,本身生物活性就低,再加上活性铝的含量较高,使培养液的 pH 降低到 6.1,酪蛋白在培养过程中就已经沉淀下来(培养后加入乙酸铅无蛋白质沉淀出现),导致测定结果出现负值。因此,本方法不宜直接用来测定强酸性土壤的蛋白酶活性。

4 结 论

通过上述探讨,我们认为土壤蛋白酶培养过程中底物的浓度为 1%、应用 pH7.6 tris-HCl 缓冲系统、50℃振荡方式培养 2 h 效果较为理想。加入 5 mmol L⁻¹的 CaCl₂ 有利于酶的激活和保护。将土壤与底物分开培养、培养结束后再将两者混合起来作为对照对于消除土壤原有氨基类物质和土壤吸附作用的影响效果良好。pH 对显色过程至关重要,pH 过低不显色或显色甚微,过高则不能形成目标颜色,只有在 pH5.8 左右时才能形成稳定的蓝紫色。多余的酪蛋白和杂质离子如 Mg²⁺、Zn²⁺、Al³⁺、HPO₄²⁻、PO₄³⁻、CO₃²⁻ 等对显色产生很大影响,因此样品测定前必须尽可能地降低这些杂质的含量。使用 Pb(CH₃COO)₂ 和 Na₂C₂O₄-CH₃COOH 试剂作为除杂剂可以在除去多余酪蛋白和杂质离子的同时形成 pH5.8 的醋酸缓冲体系,该缓冲体系非常稳定,显色效果理想。此外,显色反应前向反应体系中加入抗坏血酸,目标颜色形成后向比色液中加入适量 KIO₃ 能够显著提高茚三酮比色法的灵敏度和稳定性。

经过改进的蛋白酶活性测定方法适用于中、碱

性土壤的蛋白酶研究,且优于 Ladd 的 Folin 比色法和一般的茚三酮比色法。

参 考 文 献

- [1] Ladd J.N. Properties of proteolytic enzymes extracted from soil. *Soil Biol. Biochem.*, 1972, 4(2): 227~ 237
- [2] Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., et al. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193: 265~ 275
- [3] Dilly O., Jean-Charles Munch. Microbial biomass content, basal respiration and enzyme activities during the course of decomposition of leaf litter in a black alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) forest. *Soil Biol. Biochem.*, 1996, 28(8): 1073~ 1081
- [4] Marcote I., Teresa Hernandez, Carlos Garcia, et al. Influence of one or two successive annual applications of organic fertilizers on the enzyme activity of a soil under barley cultivation. *Bioresource Technology*, 2001, 79: 147~ 154
- [5] Dilly O., Nannipieri P. Response of ATP content, respiration rate and enzyme activities in an arable and a forest soil to nutrient additions. *Biol. Fertil. Soils*, 2001, 34: 64~ 72
- [6] Watanabe K., Hayano K. Seasonal variation of soil protease activities and their relation to proteolytic bacteria and *Bacillus* spp in paddy field soil. *Soil Biol. Biochem.*, 1995, 27(2): 197~ 203
- [7] 傅建熙主编. 有机化学. 陕西杨凌: 天则出版社, 1990. 297. Fu J.X. ed. *Organic Chemistry* (In Chinese). Yangling Shaanxi: Tianze Press, 1990. 297
- [8] 潘家秀主编. 蛋白质化学研究技术. 北京: 科学出版社, 1962. 16~ 17. Pan J.X. ed. *Technology of Protein Chemistry Research* (In Chinese). Beijing: Science Press, 1962. 16~ 17
- [9] Φ. · 哈兹耶夫著. 郑洪元, 周礼恺, 张德生译. 土壤酶活性. 北京: 科学出版社, 1980. 96. Φ. · 士^oΦ. ed. *Zheng H Y, Zhou L K, Zhang D S. trans. Soil Enzymatic Activity* (In Chinese). Beijing: Science Press, 1980. 96
- [10] Bonmati M., Ceccanti B., Nannipieri P. Protease extraction from soil by sodium pyrophosphate and chemical characterization of the extracts. *Soil Biol. Biochem.*, 1998, 30(14): 2113~ 2125
- [11] 邱秀宝, 高东, 王颖达. 短小芽孢杆菌碱性蛋白酶 BP 的纯化和性质. *微生物学报*, 1994, 34(4): 293~ 300. Qiu X.B., Gao D., Wang Y.D. Purification and some properties of protease BP from *Bacillus pumilus* (In Chinese). *Acta Microbiologica Sinica*, 1994, 34(4): 293~ 300
- [12] 张振华. α-氨基酸与茚三酮显色反应影响因素的探讨. *邵阳高等专科学校学报*, 2000, 13(1): 42~ 44. Zhang Z.H. Factors affecting colour development reaction of α-amino acid and ninhydrin (In Chinese). *Journal of Shaoyang College*, 2000, 13(1): 42~ 44
- [13] Kanimura Y., Hayano K. Properties of protease extracted from tea-field soil. *Biol. Fertil. Soils*, 2000, 30: 351~ 355
- [14] Ladd J.N., Butler J.H.A. Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biol. Biochem.*, 1972, 4: 19~ 30
- [15] 周平, 于宏川. 温度、复配原料和中性蛋白酶活力的相关性研

- 究. 宁夏农学院学报, 2003, 24(1): 38~ 39. Zhou P, Yu H C. Activity of neutral protein enzyme in relation to temperature and raw material of composite dispensation (In Chinese). Journal of Ningxia Agricultural College, 2003, 24(1): 38~ 39
- [16] 颜方贵主编. 发酵微生物学. 北京: 中国农业大学出版社, 1993. 205. Yan F G. ed. Fementation Microbiology(In Chinese). Beijing: China Agricultural University Press, 1993. 205
- [17] Azeredo L A I D, Freire D M G, Soares R M A, *et al.* Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 34: 354~ 358
- [18] 朱寿珩主编. 分析化学(第二版). 北京: 农业出版社, 1994. 326~ 327. Zhu S H. ed. Analytical Chemistry(In Chinese). 2nd Ed. Beijing: Agriculture Press, 1994. 326~ 327
- [19] 王韶唐主编. 植物生理学实验指导. 西安: 陕西科学技术出版社, 1987. 103~ 105. Wang S T ed. Directions for phytophysiological experiments (In Chinese). Xian: Shaanxi Science and Technology Press, 1987. 103~ 105
- [20] 赵爱菊, 马美范. 茚三酮比色法测定酱油氨基氮含量中试验条件的探讨. 山东轻工业学院学报, 1996, 10(2): 37~ 42. Zhao A J, Ma M F. Experimental conditions for measuring amino nitrogen content in soy sauce with ninhydrin colorimetry (In Chinese). *Journal of Shandong Institute of Light Industry*, 1996, 10(2): 37~ 42
- [21] 关松荫主编. 土壤酶及其研究法. 北京: 农业出版社, 1986. 303~ 304. Guan S Y. ed. Soil Enzymes and Their Research Methods(In Chinese). Beijing: Agriculture Press, 1986. 303~ 304

DETERMINATION OF SOIL PROTEASE ACTIVITY WITH MODIFIED NINHYDRIN COLORIMETRY

Cai Hong Shen Renfang^{*}

(State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract Much improvement has been made to the method of ninhydrin colorimetry for determination of soil protease activity. The major improvement were: introducing Ca^{2+} as protease activator, and lead acetate and sodium oxalate-acetic acid as precipitator, and using antihemorrhagic vitamin coupled with potassium iodate to improve sensitivity and stability of the ninhydrin colorimetry in quantifying the amino acid. The buffer systems of incubation and measurement were also adjusted for better performance of the ninhydrin colorimetry. Comparison between the modified method and the widely used method of Folinphenol colorimetry was made in determination of protease activity using three different soils (Fluvo-aquic soil, yellow-brown earth and red soil) and found that the modified method is much better than the Folinphenol colorimetry for neutral and alkaline soils.

Key words Soil protease; Ninhydrin; Colorimetry