

# Bradford 法测定土壤球囊霉素相关蛋白的影响因子

吕华军<sup>1,2</sup>, 刘德辉<sup>1</sup>, 董元华<sup>2①</sup>, 李建刚<sup>2</sup> (1. 南京农业大学资源与环境科学学院, 江苏 南京 210095; 2. 中国科学院南京土壤研究所土壤环境与污染修复重点实验室, 江苏 南京 210008)

**摘要:** 土壤球囊霉素相关蛋白 (glomalin-related soil protein, GRSP) 是评价土壤健康的重要指标。研究了土样粒径、贮存条件和高温提取后离心延误时间 3 个影响因子对采用 Bradford 法测定 GRSP 含量的作用效果。结果表明, 土样粒径对易提取 GRSP (EEG) 的提取测定影响显著, 过 0.074 mm 孔径筛土样中提取出的 EEG 含量高于过 0.149、0.25、1 mm 孔径筛的土样; 总 GRSP (TG) 含量的测定结果对土样粒径的变化没有明显响应, 测定 TG 含量可采用过 1 mm 孔径筛的土样。贮存条件影响 EEG 和 TG 含量的测定, 有机质含量低的土样室温保存 18 个月条件下测得的 EEG 含量低于 -20 °C 保存条件下; 有机质含量高的土样室温保存条件下测得的 EEG 含量高于 -20 °C 保存条件下; 室温保存条件下 3 个有机质含量水平的土样 TG 含量均高于 -20 °C 保存条件下。不同样品保存方式间 3 个有机质含量水平的土样 EEG 或 TG 含量差异均显著。为减小有机质降解等的影响, 宜低温保存土样。提取后延误离心将导致 EEG 含量测定值降低, 因此延误时间以控制在 1 h 之内为宜; 离心延误 2 h 内不同延误时间之间测得的 TG 含量无显著差异。

**关键词:** Bradford 法; 土壤球囊霉素相关蛋白; 土壤粒径; 贮存条件; 离心延误

**中图分类号:** S151.9<sup>+</sup>4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-4831(2011)05-0093-05

**Determination of Factors Affecting Glomalin-Related Soil Protein With Bradford Method.** LÜ Hua-jun<sup>1,2</sup>, LIU De-hui<sup>1</sup>, DONG Yuan-hua<sup>2</sup>, LI Jian-gang<sup>2</sup> (1. College of Resource and Environment, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

**Abstract:** Glomalin-related soil protein (GRSP) is an important indicator in assessing soil health. On the basis of the researches done by predecessors, further investigations were conducted of effects of soil particle size, soil sample storage conditions and delay of centrifugation of the extract after high-temperature extraction on quantification of GRSP with the Bradford method. Results show that soil particle size significantly affected extraction and determination of easily extracted GRSP (EEG). The content of EEG extracted from samples that passed a 0.074 mm sieve was significantly higher than that from samples that passed 0.149, 0.25, and 1 mm sieves, separately. However, the content of total GRSP (TG) did not vary with soil particle size, which indicate that for determination of TG, it is advisable to use soil samples that pass 1 mm sieves. Storage conditions also affected determination of EEG and TG. The content of EEG determined of the soil samples of low organic matter content stored at -20 °C for 18 months was obviously more than that stored at room temperature for the same length of time, while the content of EEG determined of soil samples of high organic matter content stored at room temperature showed a reverse trend. And TG determined of soils of three organic matter content levels stored at room temperature was obviously higher than that stored at -20 °C. So to minimize the effect of organic matter degradation, soil samples should be stored at low temperature. Delay of centrifugation of extracts may lead to decrease in the value of EEG determination. It is advisable to have the extract centrifugated within 1 h. However, there is no significant difference between delays of centrifugation within 2 h for TG determination.

**Key words:** Bradford method; glomalin-related soil protein (GRSP); soil particle size; storage condition; delay of centrifugation

球囊霉素 (glomalin) 最初是由美国农业部专家 WRIGHT 在 1996 年用 20 mmol · L<sup>-1</sup>、pH 7.0 的柠檬酸钠溶液从土壤中提取到的糖化蛋白, 研究证明该蛋白主要来源于球囊霉属 (*Glomus*) 丛枝菌根真菌 (AMF), 因此被命名为 glomalin<sup>[1-2]</sup>。球囊霉素

收稿日期: 2011-07-04

基金项目: 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (200903011); 国家农业科技成果转化资金项目 (2009GB24910540)

① 通信作者 E-mail: yhdong@issas.ac.cn

具有疏水性,不易变性,相当稳定,在土壤中的含量与土壤团聚体的水稳定性高度相关,土地利用方式改变会影响球囊霉素含量<sup>[3-4]</sup>。球囊霉素在土壤中分布广泛,土壤中球囊霉素含量有望作为评价 AMF 生长情况的替代指标。此外,球囊霉素是土壤有机质的重要组成部分。球囊霉素可以吸附土壤污染物,络合潜在有害元素,如 Pb、Zn、Cu,缓解毒害等<sup>[5-8]</sup>,研究球囊霉素对于评价土壤健康有着重要意义。

从字面上看,glomalin 指 AMF 分泌的蛋白,而采用目前的方法提取测定的球囊霉素并不完全来自 AMF,故后来 RILLIG 将其命名为 GRSP (glomalin-related soil protein),是更为符合实际情况的概括。根据提取测定方法的不同土壤中 GRSP 的定量可分为 4 种情况:EEG-Bradford 法测定易提取球囊霉素, TG-Bradford 法测定总量球囊霉素, IREEG-酶联免疫法测定易提取球囊霉素, IRTG-酶联免疫法测定总量球囊霉素<sup>[9]</sup>。由于酶联免疫法需要一种特异性抗体——MAb32B11,操作步骤繁琐,且有的实验室并不具备进行酶联免疫实验的条件,而 Bradford 法测定简便易行,因此被广泛采用。WRIGHT 的方法中采用的均为 1~2 mm 粒径土壤团聚体,有研究表明可以用过 1 mm 孔径筛的土样代替 1~2 mm 粒径团聚体来测定 GRSP 含量<sup>[10]</sup>,而更多的研究中则对土样过筛处理这一点没有作出严格明确的要求。笔者采用过不同孔径筛的均一土样来明确土样粒径对 GRSP 测定的影响,同时也为研究土壤团聚体形成中球囊霉素的作用方式提供科学依据。关于球囊霉素在土壤中的降解研究尚鲜见报道,笔者利用在不同贮存条件下保存 18 个月的土样,测定其 GRSP 含量,期望为球囊霉素的降解及其在土壤中的行为研究提供方法支持。此外, JANOS 等<sup>[11]</sup>对现有球囊霉素提取测定方法进行研究,指出其弊端之一便是样品经高温提取后延误离心会导致测定值偏小,笔者就上述问题展开进一步的研究,以期 GRSP 含量的测定提供更具体的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 土样采集与处理

于 2009 年 8 月在山东省海阳县温室大棚内以多点采样法采集 0~20 cm 耕作层土样约 1 kg。一部分原状土置于冰箱中 -20 ℃ 条件下保存,2011 年 2 月进行生物活性分析时从 -20 ℃ 冰箱中取出,室温解冻后,在室内阴凉通风处风干,过筛备用;另一部分土样采集后即风干过筛,常温贮存于土库,用于常规农化分析。供试土样的理化性质见表 1。吸湿

水含量测定方法参见文献[12]。

表 1 供试土样的理化性质

Table 1 Physico-chemical properties of soil samples

土样 编号	$w$ (有机质)/ ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	质地	pH 值	不同保存方式下的 $w$ (吸湿水)/( $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	
				室温	-20 ℃
1	24.6	砂土	4.04	12.3	4.81
2	4.4	黏土	4.91	47.3	37.3
3	41.1	砂壤	5.79	24.9	15.9
4	1.8	砂土	6.12	20.4	
5	44.6	壤土	4.94	14.4	

### 1.2 试验设计

#### 1.2.1 土壤样品粒径对易提取 GRSP (EEG)、总 GRSP (TG) 含量测定的影响

取  $w$ (有机质)为  $24.6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  的 1 号土样,分别过 1、0.25、0.149 和 0.074 mm 孔径筛,提取并测定 EEG、TG 含量。

#### 1.2.2 贮存条件对土样中 EEG、TG 含量测定的影响

选取过 1 mm 孔径筛、有机质含量不同、分别保存于常温和 -20 ℃ 条件下的 1、2、3 号土样,提取测定 EEG 含量;另外选取上述高低 2 个有机质含量水平土样,提取测定 TG 含量,以研究贮存条件对不同土壤有机质含量的土样 EEG、TG 含量测定的影响。

#### 1.2.3 离心延误时间对土样中 EEG、TG 含量测定的影响

在 JANOS 等<sup>[11]</sup>研究基础上,选取过 1 mm 孔径筛、有机质含量不同的 4 号和 5 号土样,设置延误 0、20、40、60、80、100 和 120 min 7 个离心延误时间,离心后取上清液测定 EEG 含量。选取过 1 mm 孔径筛、有机质含量不同的 2 号和 5 号土样,设置延误 0、60、90 和 120 min 4 个离心延误时间,提取 3 个循环,每个循环的上清液单独收集,分别测定,以确定离心延误对 TG 含量测定的影响。

### 1.3 试验方法

EEG 和 TG 的提取测定采用 WRIGHT 等<sup>[1-3,13-14]</sup>的方法。

EEG 提取:将 1.000 0 g 土样与 8 mL  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 7.0 柠檬酸钠溶液加入 50 mL 塑料离心管,用透气的膜封口后在 121 ℃、103 kPa 条件下提取 0.5 h,以  $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  (约 17 528  $\times g$ ) 离心 8 min,取上清液,采用 Bradford 法测定 EEG 含量。

TG 提取:将 0.500 0 g 土样与 4 mL  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 9.0 焦磷酸钠溶液加入 50 mL 塑料离心管,用透气的膜封口后在 121 ℃、103 kPa 条件下提取 1

h, 循环3次。土样粒径和土样贮存条件影响因子试验中将3次循环的上清液收集在一起待测, 离心延误时间影响因子试验中将3次循环的上清液单独收集, 分别测定。采用 Bradford 法测定 TG 含量。

考马斯亮蓝染色液配方<sup>[15]</sup>: 称取 0.100 0 g 考马斯亮蓝 G250 溶于 50 mL  $\varphi$  为 95% 的乙醇中, 然后加入 850 g · L<sup>-1</sup> 浓磷酸 100 mL, 混匀后用蒸馏水定容至 200 mL, 使用时用蒸馏水按体积比 1:5 稀释, 用前过滤。用牛白蛋白 (BSA) 作标液, 标线质量浓度范围为 0 ~ 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

#### 1.4 数据分析

采用 Excel 2003、Origin 8.0 软件对试验数据进行处理并绘图。采用 SPSS 16.0 软件进行样本平均值的 *t* 检验和单因素方差分析。在方差分析基础上, 采用 LSD 法进行差异显著性检验。

## 2 结果与讨论

### 2.1 土壤样品粒径对 EEG、TG 含量测定的影响

试验结果(表 2)显示, 土样粒径对 EEG 含量测定的影响显著。随着粒径减小, 浸提出的 EEG 增多, 以过 0.074 mm 孔径筛的土样浸提出的 EEG 为最高, 分别比过 1、0.25 和 0.149 mm 孔径筛的土样高 17.1%、12.6% 和 8.2%; 过 0.074 和 0.149 mm 孔径筛的土样浸提出的 EEG 含量均显著高于过 1 mm 孔径筛的土样。

表 2 土样粒径对 1 号土样 EEG 和 TG 含量测定的影响

Table 2 Effect of particle size on determination of EEG and TG in Soil Sample No. 1

粒径/mm	$w(\text{EEG})/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	$w(\text{TG})/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$
1	0.801 ± 0.021 <sup>c</sup>	3.162 ± 0.085 <sup>a</sup>
0.25	0.833 ± 0.015 <sup>bc</sup>	2.981 ± 0.059 <sup>a</sup>
0.149	0.867 ± 0.023 <sup>b</sup>	2.931 ± 0.053 <sup>a</sup>
0.074	0.938 ± 0.040 <sup>a</sup>	3.016 ± 0.045 <sup>a</sup>

EEG 为易提取球囊霉素相关蛋白, TG 为球囊霉素相关蛋白总量。数据为平均值 ± 标准差。同一列英文小写字母不同表示不同土样粒径处理间某指标差异显著 (LSD 检验法,  $P < 0.05$ )。

与 EEG 相比, 土样粒径对 TG 含量测定的影响不显著, 过不同孔径筛的土样提取出的 TG 含量从大到小依次为 1、0.074、0.25、0.149 mm, 不同粒径间差异均未达显著水平。

pH 7.0、20 mmol · L<sup>-1</sup> 柠檬酸钠是较为温和的提取剂, pH 9.0、100 mmol · L<sup>-1</sup> 焦磷酸钠是较为强烈的提取剂。与矿质元素在土壤中的存在状态类似, 球囊霉素在土壤中的存在状态可能也有吸附态和矿物结合态, 土样粒径对提取 EEG 时所用的 pH

7.0、20 mmol · L<sup>-1</sup> 柠檬酸钠提取物的影响较为明显, 粒径越小越有助于破坏土壤颗粒结构, 从而利于 GRSP 的释放, 提取到的 EEG 增多; 而提取 TG 时所用的 pH 9.0、100 mmol · L<sup>-1</sup> 焦磷酸钠的提取力较强, 可以提取出与土壤颗粒结合紧密的 GRSP, 故粒径大小对 TG 含量的测定没有显著影响。

WRIGHT 测定 GRSP 的方法中采用 1 ~ 2 mm 粒径的土壤团聚体。聂军等<sup>[10]</sup> 选取经长期施肥处理的不同土壤来研究不同粒径土样中 GRSP 含量, 发现可用过 1 mm 孔径筛土样代替 1 ~ 2 mm 粒径团聚体。WRIGHT 等<sup>[14]</sup> 先对不同农田系统中土壤进行团聚体分级后再测定球囊霉素含量及分布, 发现免耕土中大部分 GRSP 分布在 0.21 ~ 0.50 mm 粒径土壤颗粒中, 而深耕和强度有机耕作土壤中大部分 GRSP 分布在 0.05 ~ 0.21 mm 粒径颗粒中。故笔者认为无需筛分 1 ~ 2 mm 粒径团聚体, 可直接采用均一的干土样来测定 GRSP 含量, 由于不同粒径影响 EEG 含量测定而对 TG 含量测定没有显著影响, 可统一采用过 1 mm 孔径筛土样测定 TG 含量。

### 2.2 土样贮存条件对 EEG、TG 含量测定的影响

由图 1 可知, 有机质含量不同的土样在不同温度条件下贮存 18 个月后, EEG 含量会有所变化。在 -20 °C 贮存条件下有机质含量低 (4.4 mg · g<sup>-1</sup>) 的土样 EEG 含量比室温条件下高 20.4%, 两者差异显著; 室温保存条件下有机质含量中等 (24.6 mg · g<sup>-1</sup>) 和高 (41.1 mg · g<sup>-1</sup>) 的土样 EEG 含量分别比 -20 °C 保存条件下高 13.9% 和 15.7%。

笔者认为长期不同保存条件下影响土样 GRSP 含量测定的因子有 2 个: (1) 时间产生的负效应, 随着时间的延长, GRSP 产生降解或者转变成不易提取的部分, 表现为测得的 GRSP 含量降低; (2) 有机质降解带来的正效应, 有机质降解可能释放部分根内共生 AMF 菌丝的 GRSP 或有机质中 GRSP 或干扰测定的干扰性物质。此外, -20 °C 条件下保存的样品经历了冻融过程, 而有研究表明冻融循环会使土壤可溶性碳、氮含量增加<sup>[16]</sup>, 那么对 GRSP 含量的测定是否有类似的影响? 有关这方面的研究尚未见报道, 有待进一步研究。笔者试验中有机质含量低的土样测得的结果可主要用时间产生的负效应加以解释, 有机质含量较高的土样则可主要用有机质降解带来的正效应加以解释。

由图 1 可知, 3 种有机质含量水平的土样中测得的 TG 含量都表现为室温保存高于 -20 °C 保存。低有机质含量土壤中 EEG 含量以 -20 °C 条件下贮存的样品为高 (更为接近田间新鲜土样), 推断可能

有一部分 GRSP 已转变为不易提取的成分,所以全量提取测定的结果均以室温保存的土样 TG 含量高。这不仅说明土样贮存条件会影响 GRSP 测定结果,还揭示了 GRSP 在土壤中的可能行为,即 GRSP 本身有一部分降解,有一部分转化为不易提取的 GRSP,而有机质的降解也可能会释放部分 GRSP。

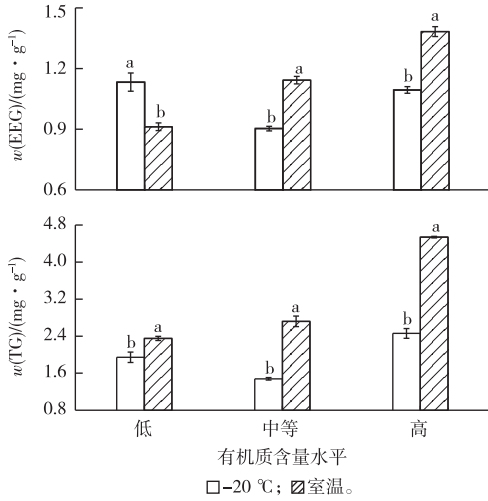


图1 土样贮存条件对 EEG、TG 含量测定的影响  
Fig.1 Effect of storage conditions on determination of EEG and TG

为避免吸湿水含量的影响,2 种贮存条件下的土样吸湿水含量分别测定并代入计算。3 个有机质含量水平分别为:低—4.4 mg·g<sup>-1</sup>, 2 号土样;中等—24.6 mg·g<sup>-1</sup>,1 号土样;高—41.1 mg·g<sup>-1</sup>, 3 号土样。EEG 为易提取球囊霉素相关蛋白,TG 为球囊霉素相关蛋白总量。同一组有机质含量水平直方图上方标记的英文小写字母不同表示不同贮存条件间某指标差异显著(*t* 检验, $P < 0.05$ )。

在室温保存的 3 个样品中有机质含量( $y, \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )与 EEG 含量( $x, \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )之间呈现显著正相关关系,  $y = 76.493x - 61.955$  ( $r = 0.993, P < 0.01$ )。从图 1 也可以看出,室温保存条件下有机质含量高的土壤中 GRSP 含量也高,这可能是由于土壤有机质中干扰物质多或者有机质降解释放所致,土壤中的单宁和多酚类物质可能干扰测定<sup>[17-18]</sup>。由此可见,不论是测定 EEG 还是 TG,样品采集后应尽快测定,否则保存时间越久,样品中发生的变化越不确定。建议低温保存,以减小有机质降解对 GRSP 含量测定的影响。

### 2.3 高温提取后离心延误时间对土样 EEG、TG 含量测定的影响

#### 2.3.1 离心延误时间对 EEG 提取测定的影响

由图 2 可见,离心延误时间对 EEG 的提取有影响,有机质含量高的土样 EEG 提取量对延误时间的响应更明显,这可能是土壤颗粒重新吸附的原因。

JANOS 等<sup>[11]</sup>曾研究高温持续时间和离心延误对 EEG 提取的影响,笔者试验结果与之吻合。根据图 2 不同离心延误时间测得的土样 EEG 含量之间的差异显著性分析结果,建议高温灭菌后尽快离心,离心延误时间不宜超过 1 h。

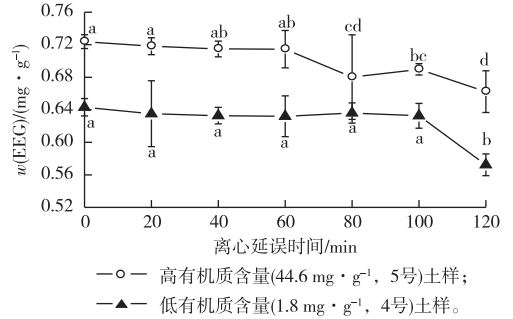


图2 离心延误时间对 2 个有机质含量水平的土样 EEG 提取测定的影响  
Fig.2 Effect of delay of centrifugation on determination of EEG in two soils different in organic matter content

#### 2.3.2 离心延误时间对 TG 提取测定的影响

离心延误时间对土样 TG 提取测定的影响见图 3。

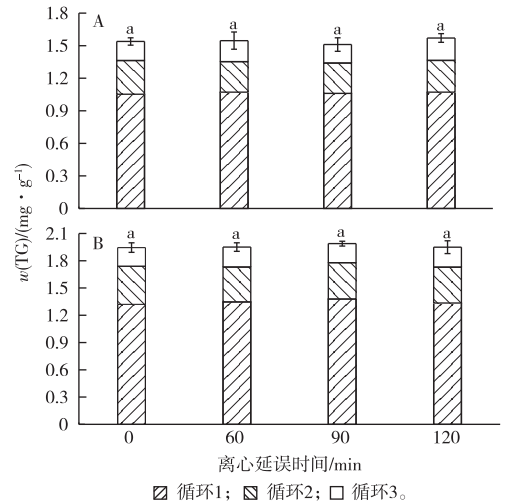


图3 离心延误时间对 2 个不同有机质含量水平的土样 TG 提取测定的影响  
Fig.3 Effect of delay of centrifugation on determination of TG in two soils different in organic matter content

图3 离心延误时间对 2 个不同有机质含量水平的土样 TG 提取测定的影响  
Fig.3 Effect of delay of centrifugation on determination of TG in two soils different in organic matter content

由图3可见,采用 pH 9.0、100 mmol · L<sup>-1</sup> 焦磷酸钠作为提取剂,3次提取测定 GRSP 总量,离心延误 120 min 内均无显著差异。这可能是因为 100 mmol · L<sup>-1</sup>、pH 9.0 焦磷酸钠溶液的提取力较强,第1个提取循环中 GRSP 提取量因离心延误有细微差异,但在随后的提取过程中则有所补偿,3个提取循环之后得到 GRSP 提取量的总和在离心延误 2 h 内未表现出显著差异。试验中前2个提取循环已经提取出 85%~90% 的 GRSP,第3个循环时上清液颜色已经很淡,表明提取已接近终点。这说明 pH 9.0、100 mmol · L<sup>-1</sup> 焦磷酸钠用作提取剂提取测定 GRSP 总量的试验可以在离心延误 2 h 内进行,而不必担心提取后延误离心会造成重复间的差异,因此,在样品较多的情况下,可根据实验室灭菌锅和离心机的容量在进行第1次提取循环时安排尽可能多的样品。

### 3 结论

运用 Bradford 法测定土壤中 GRSP 含量的试验应注意以下几点:

不同土样粒径对 TG 的提取测定影响不大,但是对 EEG 的提取测定影响显著。由于过 1 mm 孔径筛的土样与 1~2 mm 粒径土壤团聚体中 GRSP 含量高度相关,且 GRSP 在不同粒级团聚体中的分布会因土地利用方式而异,故建议采用过 1 mm 孔径筛的均一土样替代 1~2 mm 粒径土壤团聚体。

土壤样品的贮存条件会影响 Bradford 法测定土壤中 GRSP 含量。由于贮存时因部分 GRSP 转化为难提取成分而可能发生自身损耗,或者有机质的降解会释放 GRSP,或者产生干扰 GRSP 测定的物质,因此应尽早测定,建议低温条件下贮存,以减小有机质降解等因素产生的影响。

离心延误会影响 EEG 含量的测定(20 mmol · L<sup>-1</sup>、pH 7.0 柠檬酸钠作提取剂),因此,应尽快离心,将延误时间控制在 1 h 以内;离心延误 120 min 对 TG 含量的测定(100 mmol · L<sup>-1</sup>、pH 9.0 焦磷酸钠作提取剂)没有显著影响。

#### 参考文献:

[1] WRIGHT S F, UPADHYAYA A. Extraction of an Abundant and Unusual Protein From Soil and Comparison With Hyphal Protein of Arbuscular Mycorrhizal Fungi[J]. Soil Science Society of America Journal, 1996, 161(9): 575-586.

[2] WRIGHT S F, FRANKE-SNYDER M, MORTON J B, *et al.* Time-Course Study and Partial Characterization of a Protein on Hyphae of Arbuscular Mycorrhizal Fungi During Active Colonization of

Roots[J]. Plant and Soil, 1996, 181(2): 193-203.

[3] WRIGHT S F, UPADHYAYA A. A Survey of Soils for Aggregate Stability and Glomalin, a Glycoprotein Produced by Hyphae of Arbuscular Mycorrhizal Fungi[J]. Plant and Soil, 1998, 198(1): 97-107.

[4] RILLIG M C, WRIGHT S F, EVINER V T. The Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Glomalin in Soil Aggregation Comparing Effects of Five Plant Species[J]. Plant and Soil, 2002, 238(2): 325-333.

[5] GONZALEZCHAVE M C, CARRILLO-GONZA' LEZ R, WRIGHT S F, *et al.* The Role of Glomalin, a Protein Produced by Arbuscular Mycorrhizal Fungi, in Sequestering Potentially Toxic Elements[J]. Environmental Pollution, 2004, 130(3): 317-323.

[6] VODNIK D, GRČMAN H, MAČEK I, *et al.* The Contribution of Glomalin-Related Soil Protein to Pb and Zn Sequestration in Polluted Soil[J]. Science of the Total Environment, 2008, 392(1): 130-136.

[7] FERROL N, GONZÁLEZ-GUERRERO M, VALDERAS A, *et al.* Survival Strategies of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Cu-Polluted Environments[J]. Phytochemistry Reviews, 2009, 8(3): 551-559.

[8] ZHOU Y, YAO J, CHOI M M F, *et al.* A Combination Method to Study Microbial Communities and Activities in Zinc Contaminated Soil[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 169(1/2/3): 875-881.

[9] RILLIG M C. Arbuscular Mycorrhizae, Glomalin, and Soil Aggregation[J]. Canadian Journal of Soil Science, 2004, 84(4): 355-363.

[10] 聂军, 周健民, 王火焰, 等. 长期施肥条件下不同粒径土壤团聚体中 Bradford 反应土壤蛋白质含量的差异[J]. 土壤学报, 2008, 45(6): 1072-1080.

[11] JANOS D P, GARAMSZEI S, BELTRAN B. Glomalin Extraction and Measurement[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2008, 40(3): 728-739.

[12] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2005: 25-135.

[13] WRIGHT S F, NICHOLS K A, SCHMIDT W F. Comparison of Efficacy of Three Extractants to Solubilize Glomalin on Hyphae and in Soil[J]. Chemosphere, 2006, 64(7): 1219-1224.

[14] WRIGHT S F, GREEN V S, CAVIGELLI M A. Glomalin in Aggregate Size Classes From Three Different Farming Systems[J]. Soil and Tillage Research, 2007, 94(2): 546-549.

[15] BRADFORD M M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.

[16] 周旺明, 王金达, 刘景双, 等. 冻融对湿地土壤可溶性碳、氮和氮矿化的影响[J]. 生态与农村环境学报, 2008, 24(3): 1-6.

[17] ROSIER C L, HOYE A T, RILLIG M C. Glomalin-Related Soil Protein: Assessment of Current Detection and Quantification Tools[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2006, 38(8): 2205-2211.

[18] KILKOWSKI W J, GROSS G G. Color Reaction of Hydrolyzable Tannins With Bradford Reagent, Coomassie Brilliant Blue[J]. Phytochemistry, 1999, 51(3): 363-366.

作者简介: 吕华军(1986—), 女, 山东济宁人, 硕士生, 主要从事土壤生态学研究。E-mail: lhj312028@yahoo.com.cn