

土壤脲酶测试盒说明书

(货号: A121-1-1 Solid-Urease,S-UE 分光光度法 50T/24 样)

一、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 3 个月)

试剂编号	试剂名称	试剂装量	保存
试剂一	甲苯	-	客户自备
试剂二	底物液	15mL×1 瓶	4°C保存
试剂三	缓冲液	60mL×1 瓶	4°C保存
试剂四	基质 A 液	2mL×1 瓶	4°C保存
	基质 B 液	2mL×1 瓶	4°C保存
试剂四基质应用液的配制: 把 A 液:B 液:蒸馏水按 1:1:3 的比例混合, 现用现配。			
试剂五	显色液	5mL×1 瓶	4°C保存
试剂六	240µg/mL 氮标准溶液	5mL×1 支	4°C保存

二、自备仪器及试剂:

可见光分光光度计及 1cm 规格比色皿(或酶标仪及 96 孔板)、台式离心机、可调移液器、电子秤、漩涡混匀器、水浴锅(或恒温箱)、试管(或离心管)、甲苯(分析纯)、蒸馏水(要求无氨)。

三、操作步骤:

1、培养反应:

	测定管	对照管
风干土样 (g)	0.2	0.2
甲苯 (µL)	100	100
震荡混匀, 使土样全部湿润, 室温静置 15min		
试剂二 (µL)	500	-
蒸馏水 (µL)	-	500
试剂三 (µL)	1000	1000
混匀, 37°C 孵育 24h 后, 混匀, 10000 转/min 常温离心 10min, 取上清液备用		

2、将上清液用蒸馏水 10 倍 (1:9) 稀释后, 作显色反应。

3、显色反应:

	测定管	对照管	标准管
稀释后的上清液 (µL)	400	400	-
不同浓度的氮标准液 (µL)	-	-	400
试剂四基质应用液 (µL)	80	80	80
试剂五 (µL)	60	60	60
混匀, 室温静置 20min			
蒸馏水 (µL)	460	460	460
混匀, 波长 578 nm, 蒸馏水调零, 分光光度计测定各管吸光值 A (或是每管吸出 0.2mL 反应液, 加到 96 孔板中, 酶标仪 578nm 处读数)			

注: 每个待测样本需设定一个测定管和一个对照管; 标准管用于制作标准曲线, 详见附录 1; 比色时, 溶液呈现靛酚的蓝色, 在 1h 内保持稳定

四、单位定义与计算:

单位定义: 每天每 g 土样中产生 1µg NH₃-N 为一个酶活力单位 (U)。

计算公式:

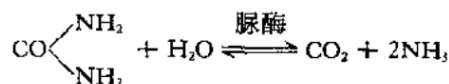
土壤脲酶活力 (U/g 土样) = 代入标曲计算得得上清氮浓度 × V_培 ÷ W × N

V_培: 培养反应体系液体总体积, 1.6mL;

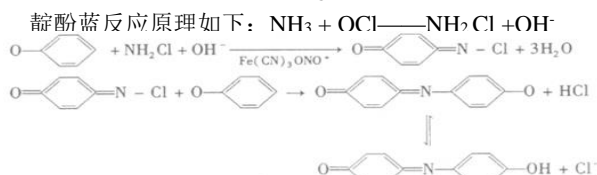
W: 土壤质量, g; N: 上清液稀释倍数, 10。

五、测定原理:

脲酶是一种高度专性的酶, 能酶促尿素的水解, 其反应式如下:



由此可以测定氨的量。NH₄⁺在强碱性介质中与次氯酸盐和苯酚反应, 生成水溶性染料靛酚蓝, 其深浅与溶液中的 NH₄⁺-N 含量呈正比, 线性范围为 0.05~0.5mg/L 之间。



六、测定意义:

大多数细菌、真菌和高等植物均有脲酶。它是一种酰胺酶, 能酶促有机质分子中的肽键水解。土壤的脲酶活性与土壤的微生物数量、有机物质含量、全氮和速效氮含量呈正相关。人们常用土壤的脲酶活性表征土壤的氮素状况。

附录 I: 标准曲线的制备

1、前处理:

将 240µg/mL 的氮标准液用蒸馏水 1:11 稀释成 20µg/mL 氮标准液进行标准曲线的制备。

2、操作表:

编号	S1	S2	S3	S4	S5
20µg/mL 氮标准液 (µL)	0	100	200	300	400
蒸馏水 (µL)	400	300	200	100	0
试剂四基质应用液 (µL)	80	80	80	80	80
试剂五 (µL)	60	60	60	60	60
混匀, 室温静置 20min					
蒸馏水 (µL)	460	460	460	460	460
混匀, 波长 578 nm, 蒸馏水调零, 分光光度计测定各管吸光值 A。					

3、测定结果:

编号	相当于氮标准浓度 (µg/mL)	测定 OD	绝对 OD
S1	0	0.008	0
S2	5	0.191	0.183
S3	10	0.381	0.373
S4	15	0.553	0.545
S5	20	0.713	0.705

4、绘图如下:

