

土壤脲酶 (Soil-Urease, S-UE) 测定试剂盒说明书

(货号: G0301W96 微板法 96 样)

一、产品简介:

土壤中的脲酶主要来源于微生物和植物, 它仅能水解土壤中的尿素, 最终产物是氨和碳酸。土壤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。常用土壤脲酶活性表征土壤的氮素状况。本试剂盒采用靛酚蓝比色法: 即脲酶水解尿素产生 $\text{NH}_3\text{-N}$, 其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, 该物质在578nm有最大光吸收, 其深浅与溶液中的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量呈正比, 进而得出土壤脲酶活力大小。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉剂 mg $\times$ 1 瓶	4 $^{\circ}\text{C}$ 保存	临用前加入 22mL 蒸馏水, 充分溶解备用, 用不完的试剂仍 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存;
试剂二	液体 120mL $\times$ 1 瓶	4 $^{\circ}\text{C}$ 保存	
试剂三	液体 12mL $\times$ 1 瓶	4 $^{\circ}\text{C}$ 保存	避光保存。
试剂四	液体 6mL $\times$ 1 瓶	4 $^{\circ}\text{C}$ 保存	
试剂五	A: 液体 3.5mL $\times$ 4 瓶 B: 液体 μL $\times$ 1 支	4 $^{\circ}\text{C}$ 保存	临用前取 30 μL 的 B 液进一瓶 A 液中, 混匀后作为试剂五使用。混匀后的试剂五一周内用完。
标准品	液体 1 mL $\times$ 1 支	4 $^{\circ}\text{C}$ 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、水浴锅、离心机、可调式移液器、甲苯和蒸馏水。

四、土壤脲酶 (S-UE) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本的制备:

取新鲜土样风干或者 37 度烘箱风干, 先粗研磨, 过 40 目筛网, 备用。

【注】: 土壤风干, 可减少土壤中水分对于实验的干扰;

2、上机检测:

① 培养: 取 EP 管依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
土样(g)	0.1	0.1
甲苯	40	40
振荡混匀, 室温放置 15min		
试剂一	200	
试剂二	400	600
混匀, 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅或恒温培养箱中孵育 24h		
蒸馏水 (37 $^{\circ}\text{C}$)	360	360
混匀, 12000rpm, 25 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10min, 取上清液。		

② 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 578nm。

③ 显色反应：在 96 孔板中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
上清液	15	15
蒸馏水	45	45
试剂三	60	60
试剂四	30	30
试剂五	60	60
混匀，37℃放置 20min 后，于 578nm 读取吸光值 A， ΔA=A 测定管-A 对照管（每个样本做一个自身对照）。		

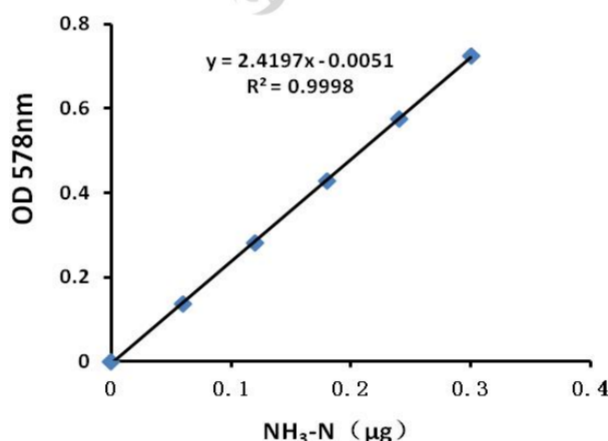
【注】1. 试剂三和四和五需分开加，不能事先混匀。

2. 若 ΔA 值较小，可增加取样质量 W（如 0.2g 或更多）或在显色反应阶段增加上清液量 V1（如增至 30μL，则蒸馏水体积相应减少）；则改变后的 W 和 V1 需代入计算公式重新计算。

3. 若 A 测定值大于 1.5，可在显色反应阶段减少上清液量 V1（如减至 5μL，则蒸馏水体积相应增加）或对上清液用蒸馏水稀释后再取 15μL 检测；则改变后的上清液体积 V1 和稀释倍数 D 需代入计算公式重新计算。若预实验得出该批土壤脲酶活性较大也可采取缩短 37℃ 孵育时间 T（如缩至 4h 后再加蒸馏水后测定），则改变后的 T 带入公式计算。

五、结果计算：

1、标准曲线：y=2.4197x-0.0051；x 为标准品质量 (μg)，y 为吸光值 ΔA。



2、土壤脲酶活性定义：每天每克土样中产生 1μg 的 NH₃-N 定义为一个酶活力单位。

$$\text{土壤脲酶活力}(\mu\text{g/d/g 土样}) = (\Delta A + 0.0051) \div 2.4197 \times (V \div V1) \div W \div T \times D$$

$$= 27.6 \times (\Delta A + 0.0051) \div W \times D$$

V---反应总体积，1000μL；

V1---显色反应中上清液体积，15μL；

T---反应时间，24h=1d；

W---土壤样本实际取样质量，g；

D--稀释倍数，未稀释即为 1。

附：标准曲线制作过程：

- 1 把标准品母液（1mg/mL），用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品：0.4, 8, 12, 16, 20. μg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 2 在显色反应阶段，按照测定管加样表操作，依据结果即可制作标准曲线。