

土壤精氨酸脱氨酶活性测定试剂盒说明书

(货号: BP10080F 分光法 24 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

氮素是限制植物生长发育的主要营养元素之一, 土壤氮素是植物氮素营养的主要来源。其中土壤精氨酸脱氨酶也与土壤中氮转化有着密切关系。

本试剂盒利用精氨酸脱氨酶水解精氨酸生成 $\text{NH}_3\text{-N}$, 该产物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, 通过检测生成的有色物质在630nm的最大光吸收峰, 进而得出土壤精氨酸脱氨酶活力大小。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	粉剂 1 瓶	4°C保存	1. 临用前加入 18mL 蒸馏水, 充分溶解备用; 2. 用不完的试剂仍 4°C保存;
试剂二	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 13mL×1 瓶	4°C避光保存	
试剂四	液体 7mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	A: 液体 7mL×2 瓶 B: 液体 1 支	4°C保存	1. 临用前取 60μL 的 B 液进一瓶 A 液中, 混匀后作为试剂五使用; 2. 混匀后的试剂五一周内用完。
		4°C避光保存	
标准品	液体 1 mL×1 支	4°C保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

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。

2、检测步骤:

① 培养: 取 EP 管依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
土样(g)	0.5	0.5
试剂一	600	
蒸馏水		600
混匀, 放入 37°C水浴锅或恒温培养箱中孵育 3 小时		
试剂二	600	600

震荡提取 30min, 8000rpm, 25℃离心 5min, 取上清液。

② 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 630nm。

③ 显色反应: 在 EP 管中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
上清液	60	60
蒸馏水	180	180
试剂三	240	240
试剂四	120	120
试剂五	240	240
混匀, 37℃放置 20min 后, 于 630nm 读取吸光值 A, 全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ (每个样本做一个自身对照)。		

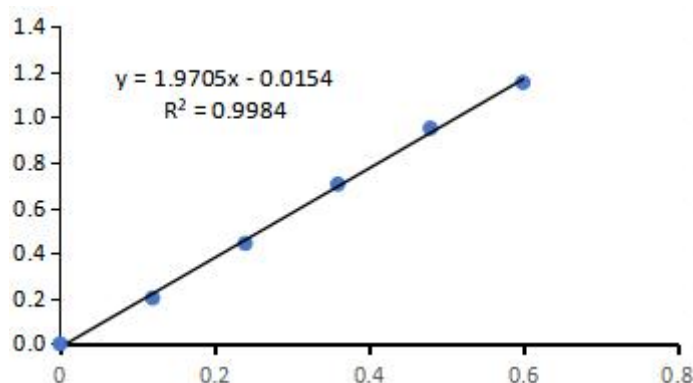
【注】1. 试剂三和四和五需分开加, 不能事先混匀。

2. 若 ΔA 值较小, 可增加 37℃孵育时间 T (如由 3 小时增至 6 小时或更多) 或在显色反应阶段增加上清液量 V1 (如增至 120μL, 则蒸馏水体积相应减少); 则改变后的 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

3. 若 A 测定的值大于 1.5, 可在显色反应阶段减少上清液量 V1 (如减至 20μL, 则蒸馏水体积相应增加); 则改变后的上清液体积 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线: $y = 1.9705x - 0.0154$; x 为标准品质量 (μg), y 为吸光值 ΔA 。



2、土壤酶活定义: 每天每克土样中产生 1μg 的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{土壤精氨酸脱氨酶活力} (\mu\text{g/d/g 土样}) &= (\Delta A + 0.0154) \div 1.9705 \times (V \div V1) \div W \div T \\ &= 81.2 \times (\Delta A + 0.0154) \div W \end{aligned}$$

V---反应总体积, 1200μL;

V1---显色反应中上清液体积, 60μL;

T---反应时间, 3h=1/8d;

W---土壤样本实际取样质量, g。

附: 标准曲线制作过程:

- 标准品母液浓度为 1mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 2, 4, 6, 8, 10. μg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 标品稀释参照表如下:

1. 吸取标准品母液 100uL, 加入 900uL 蒸馏水, 混匀得到 100ug/mL 的标品稀释液待用;

2. 吸取 100ug/mL 的标品稀释液 100uL，加入 900uL 蒸馏水，混匀得到 10ug/mL 的标品稀释液待用。

标品浓度 μg/mL	0	2	4	6	8	10
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据显色反应阶段测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	60	
蒸馏水	180	240
试剂三	240	240
试剂四	120	120
试剂五	240	240
混匀，37°C 放置 20min 后，于 630nm 读取吸光值 A，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		