

土壤脲酶（S-UE）试剂盒说明书

（货号：BP10123W-96 微板法 96 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

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 22mL 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 120mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂三	液体 12mL×1 瓶	4°C 避光保存	
试剂四	液体 6mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂五	A: 液体 3.5mL×4 瓶 B: 液体 1 支	4°C 避光保存	1. 临用前取 30μL 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。
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）、96 孔板、离心管、酶标仪、甲苯、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。

【注】：土壤风干，可减少土壤中水分对于实验的干扰；

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)	0.1	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℃水浴锅或恒温培养箱中孵育 24h		
蒸馏水 (37℃)	360	360
混匀，12000rpm，25℃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：

试剂组分 (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， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

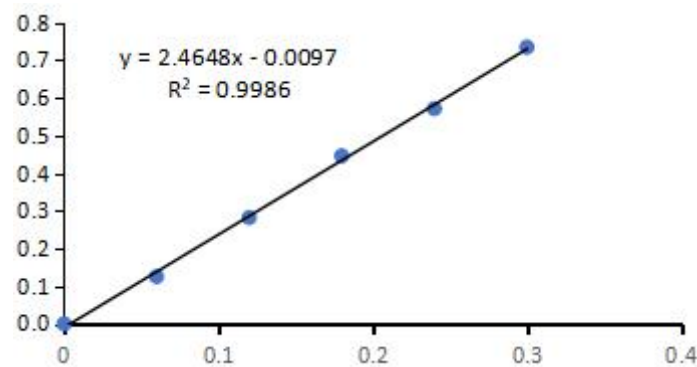
【注】1. 试剂三和四和五需分开加，不能事先混匀。

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 V_1 (如增至 30 μ L，则蒸馏水体积相应减少)；则改变后的 W 和 V_1 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的量 V_1 (如减至 5 μ L，则蒸馏水体积相应增加)；则改变后的上清液体积 V_1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y=2.4648x - 0.0097$ ； x 为标准品质量 (μ g)， y 为吸光值 ΔA 。



2、土壤脲酶活性定义：每天每克土样中产生 1 μ g 的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 定义为一个酶活力单位。

$$\text{土壤脲酶活力}(\mu\text{g/d/g 土样}) = (\Delta A + 0.0097) \div 2.4648 \times (V \div V_1) \div W \div T = 27.05 \times (\Delta A + 0.0097) \div W$$

V ---反应总体积，1000 μ L；

V_1 ---显色反应中上清液体积，15 μ L；

T ---反应时间，24h=1d；

W ---土壤样本实际取样质量，g。

附：标准曲线制作过程：

1 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：0,4,8,12,16,20. μ g/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

1. 吸取标准品母液 20 μ L，加入 980 μ L 蒸馏水，混匀得到 20 μ g/mL 的标品稀释液；

标品浓度 μg/mL	0	4	8	12	16	20
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	15	
蒸馏水	45	60
试剂三	60	60
试剂四	30	30
试剂五	60	60
混匀，37°C放置 20min 后，于 578nm 读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$		