

土壤尿酸酶活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

规格：50T/24S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 2 mL×1 瓶（自备）	4°C保存
试剂二 A 液	液体 0.5 mL×1 支	4°C保存
试剂二 B 液	液体 17.5 mL×1 瓶	4°C保存
试剂三	液体 40 mL×1 瓶	4°C保存
试剂四	液体 60 mL×1 瓶	4°C保存
标准品	液体 1 mL×1 支	4°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前按照试剂二 A 液：试剂二 B 液= 1：35 的比例混合，根据样本量所需使用当天现配现用；
- 2、标准品：5 $\mu\text{mol/mL}$ 的尿酸溶液。

产品说明：

土壤尿酸酶是一种与核酸代谢有关的氧化还原酶，主要是将土壤中的核酸腺嘌呤与尿酸等物质转化成尿囊素和尿囊酸，进而生成尿素供植物利用。

土壤尿酸酶能够催化尿酸生成尿囊素、 CO_2 和 H_2O_2 ，尿酸在 284 nm 有特征吸收峰，通过测定反应前后尿酸的减少量，来表示土壤尿酸酶活性。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1 mL 石英比色皿、冰、30~50 目筛、甲苯（不允许快递）和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

新鲜土样自然风干或 37°C 烘箱风干，过 30~50 目筛。

二、测定步骤

1、紫外分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 284 nm，蒸馏水调零。

2、将 5 $\mu\text{mol/mL}$ 标准溶液用蒸馏水倍比稀释为 0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.015625 $\mu\text{mol/mL}$ 标准溶液。

3、加样表：

试剂名称	测定管	对照管	无土管	标准管	空白管
风干土样 (g)	0.1	0.1	-	-	-
试剂一 (μL)	25	25	25	-	-
充分振荡, 使土样全部湿润, 室温放置 30 min。					
试剂二 (μL)	500	-	500	-	-
蒸馏水 (μL)	500	500	500	-	-
试剂三 (μL)	500	1000	500	-	-
振荡混匀, 30°C恒温培养 24 h; 10000 rpm, 25°C, 离心 10 min, 取上清。					
上清液 (μL)	150	150	150	-	-
标准液 (μL)	-	-	-	150	-
蒸馏水 (μL)	-	-	-	-	150
试剂四 (μL)	850	850	850	850	850

充分混匀, 于 1 mL 石英比色皿中测定 284 nm 处吸光值, 记为 A 测定管、A 对照管、A 无土管、A 标准管和 A 空白管。计算 $\Delta A = (A \text{ 无土管} - A \text{ 空白管}) - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管})$ 、 $\Delta A \text{ 标准} = A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}$ 。每个测定管需设一个对照管, 同一批次样本检测无土管只需检测 1-2 管。

三、土壤尿酸酶活性计算

1、标准曲线的绘制:

以各个标准溶液的浓度为 x 轴, 其对应的 ΔA 标准为 y 轴, 绘制标准曲线, 得到标准方程 $y = kx + b$, 将 ΔA 带入方程得到 x ($\mu\text{mol/mL}$)。

2、土壤尿酸酶活性的计算:

酶活定义: 每天每 g 土样中消耗 1 μmol 的尿酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{土壤尿酸酶活力 (U/g 土样)} = x \times V \text{ 反总} \div W \div T = 1.525x \div W$$

T: 反应时间, 1 d = 24 h; V 反总: 反应体系总体积: 1.525 mL; W: 样本质量, g。

实验实例:

1、称取两管 2-1-20 号土样 0.1g, 按照操作步骤进行测定, 测得计算 $\Delta A = (A \text{ 无土管} - A \text{ 空白管}) - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) = (1.136 - 0.001) - (0.703 - 0.05) = 0.482$, 带入标准曲线 $y = 1.7444x - 0.0013$, 计算 $x = 0.2771$, 按照计算公式计算酶活得:

$$\text{土壤尿酸酶活力 (U/g 土样)} = 1.525 \times x \div W = 1.525 \times 0.2771 \div 0.1 = 4.226 \text{ U/g 土样。}$$