**荧光法测定酶流程**

1. **药品制备**

1: 10umol/l标准物质：称取0.1762g标准物质溶于100ml甲醇溶液中，吸取1ml该溶液溶于1L水中

2；200umol/L荧光底物

**3;4-MUB –β-D-乙酰基氨基葡萄糖苷**（4-MUB-N-acetyl-B-D-glucosaminidase）7.58mg溶解于100ml水中

4;阴性孔试剂配制:10ml离心管:6ml蒸馏水+1.5mL底物+180ul NaOH

参考孔试剂配制:10m离心管:6ml蒸馏水+1.5mL标准物质+180 ul NaOH

二、浸提培养过程

1称取新鲜土壤1g置于塑料瓶内(250m)，加蒸馏水125ml，震荡2h(25℃l80r/min)

2测定样品：招匀悬浊液，吸取1ml的悬液于离心管内（2ml）,加入荧光底物0.25ml,吸取三份（分别加入不同荧光底物），摇匀。

3空自样品：摇匀悬浊液，吸取1ml的悬浊液于离心管内（2ml）,加入馏水0.25ml,吸取三份摇匀

4淬火标准样品：摇匀悬浊液，吸取1ml的悬浊液于离心管内(2m)，加入标准物质溶液0.25ml吸取3份，摇匀

5 25℃避光培养4h

6步骤2、3和4的离心管加50ul 0.5 mol/L NaOH终止反应，加液后摇匀

7转移250ul至96孔酶标板上：(参見酶标版示意图)，注意转移时，先摇匀悬浊液再吸样

三、上机测定

4MUB激发波长为365nm，检测波长450nm

四、土壤酶活的计算

土壤酶活性计算公式为： Ab=FV/(e V1 tm)： F=(f-fb)/q-fs e=fr/(cs V2)：q=(fq-fb)/fr

式中：Ab为土壤样品的酶活性(nmol/g/h)；F为校正后的样品荧光值：V为土壤悬浊液的总保积；V1为微孔板每孔中加入的样品悬浊液的体积：t为暗培养时间；m为干土样的质量(1g鲜士样换算成干土样的结果) f为酶标仪读取样品微孔的荧光值：fb为空白微孔的荧光值：q为淬火系数；fs为阴性对照微孔的荧光值：e为荧光释放系数 fr为参考标准微孔的荧光值；cs为参考标准微孔的浓度：V2为加入参考标准物的体积

fq为淬火标准微孔的荧光值。

酶标板样品分布图

