

土壤荧光素二乙酸酯 (Fluorescein diacetate, FDA) 水解酶试剂盒说明书

(货号: ADS-F-TR019-48 分光法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

土壤荧光素二乙酸酯(FDA)水解酶与土壤总碳、全氮、全磷等土壤养分指标间关系密切,与微生物活性间的相关性比其他酶活性更显著,同时也能够很好地反映系统中有机质的转化和土壤中微生物的活性,是土壤健康质量的微生物学指标之一。

FDA 是一种无色化合物,在介质中能被许多土壤酶所催化水解,并经脱水反应,产生酶解终产物—荧光素,该黄色产物在 490nm 处有强吸收峰,通过检测 490nm 处的吸光值变化即可得出 FDA 水解酶活性。

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	110mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 1 瓶	4℃避光保存	1. 临用前加 3mL 丙酮充分溶解备用; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉体 1 支	4℃避光保存	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、丙酮、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、样本处理:

取新鲜土样风干或 37℃烘箱风干,先粗研磨过 40 目筛备用。

[注]: 土壤风干,减少土壤中水分对于实验的干扰;土壤过筛,保证取样的均匀细腻;

2、检测步骤:

① 可见分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 490nm,蒸馏水调零。

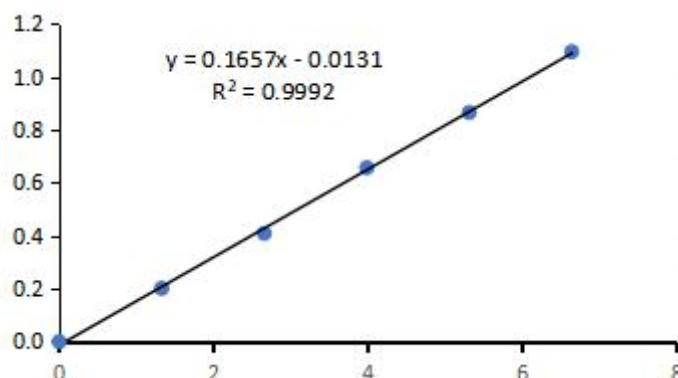
② 在 EP 管中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
土样 (g)	0.05	0.05
试剂一	1000	1000
试剂二	50	
丙酮		50
混匀, 37℃反应 1h		
丙酮	150	150
混匀, 12000 rpm 离心 10min, 取全部上清液转移至 1mL 玻璃比色皿中, 于 490nm 下读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。		

【注】: 若 ΔA 的差值较大, 超过 1.5, 可以降低土壤取样量, 或者反应产物用蒸馏水稀释之后再检测, 则稀释倍数 D 代入计算公式。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.1657x - 0.0131$ ； x 为标准品质量(μg)， y 为 ΔA 。



2、活性定义：每小时每克土样中产生 $1\mu\text{g}$ 荧光素定义为一个酶活力单位。

$$\text{FDA 活性}(\mu\text{g/h/g}) = (\Delta A + 0.0131) \div 0.1657 \div W \div T \times D = 6 \times (\Delta A + 0.0131) \div W \times D$$

T---反应时间，1h；

W---土壤样本实际取样量；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

荧光素分子量---332.31。

附：标准曲线制作过程：

1 向标准品 EP 管里面加入 1 mL 丙酮溶解，再加 1 mL 水（母液需在两天内用且 -20°C 保存），标准品母液浓度为 $5\mu\text{mol/mL}$ 。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, $1\mu\text{mol/mL}$ 。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：

吸取标准品母液 200uL，加入 800uL 蒸馏水，混匀得到 $1\mu\text{mol/mL}$ 的标品稀释液待用。						
标品浓度 $\mu\text{mol/mL}$	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
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	20	
蒸馏水		20
试剂一	1000	1000
丙酮	180	180
混匀，取全部上清液转移至 1mL 玻璃比色皿中，于 490nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		

