

土壤荧光素二乙酸酯 (Fluorescein diacetate, FDA) 水解酶试剂盒说明书 (分光法 48 样)

一、产品简介:

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

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	110mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉体 mg×1 瓶	4℃ 保存	临用前加 3mL 丙酮充分溶解备用
标准品	粉体 mg×1 支	4℃ 保存	若重新做标曲,则用到该试剂

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、可调式移液器、天平、低温离心机、恒温水浴锅、丙酮。

四、FDA 水解酶(FDA)活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

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、上机检测:

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

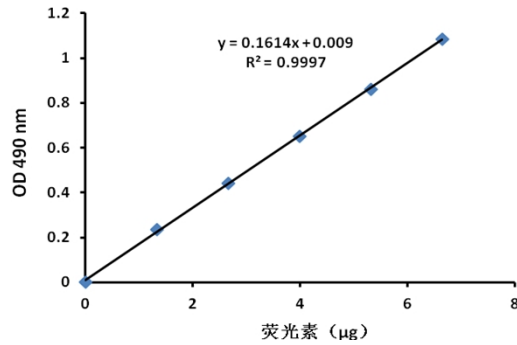
② 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (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: $y = 0.1614x + 0.009$: 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 1μg 荧光素定义为一个酶活力单位。

$$\text{FDA 活性}(\mu\text{g/h/g}) = (\Delta A - 0.009) \div 0.1614 \div W \div T \times D = 6.2 \times (\Delta A - 0.009) \div W \times D$$

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 制备标准品母液（5μmol/mL）：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℃保存）。
- 2 把母液用试剂一稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. μmol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 按照 20μL 标准品+1mL 试剂一+180μL 丙酮的体系来操作，依据结果即可制作标准曲线。