

土壤脱氢酶（Soil dehydrogenase, S-DHA）试剂盒说明书

(微板法 96 样)

一、产品简介：

土壤脱氢酶的活性可以反映土壤体系内活性微生物量以及其对有机物的降解活性，以评价降解性能。传统方法是用氯化三苯基四氮唑（TTC）作为脱氢酶的氢受体，但生成的有色物质甲臜是不溶于水以至操作麻烦，且灵敏度低；本试剂盒提供一种简单，灵敏，快速的测定方法，利用改性的氮四唑盐作为氢受体，其生成的黄色甲臜物质易溶于水，于 460nm 测定其吸光值，即得土壤脱氢酶活性。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求
试剂一	液体 6mL×1 瓶	4℃保存
试剂二	液体 80mL×1 瓶	4℃保存

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、筛子、天平、恒温培养箱或水浴锅、低温离心机。

四、土壤脱氢酶的测定：

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、**样本制备：**取新鲜土样过 40 目筛网，备用。

2、**测定步骤：**

① 酶标仪预热 30 min，调节波长到 460 nm。

② 在 EP 管内依次加入：

试剂名称（ μL ）	测定管	空白管
鲜土	0.1g	
试剂一	60	60
试剂二	640	640

剧烈混匀几次，37℃（水浴锅或恒温培养箱）避光培养 4h（中间隔段时间晃动几下），12000rpm 离心 5min，取 200 μL 上清液转移到 96 孔板中，460nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。

【注】1.注意观察，随着反应时间的延长，反应液呈现黄色，酶活性越大，黄色越深。

2.若同时检测不同背景下的土壤样本（如黑土，红土，黄土等），则需增加样本自身对照管，即空白管变为对照管（0.1g 鲜土+700 μL 试剂二）， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

3.对于活性较高的样本，若培养 4 小时，A 值测定超过 2 以上，可缩减培养时间 T（如改为 2 个小时），则改变后的 T 需代入计算公式重新计算。

4. ΔA 小于 0.01，可增加培养时间 T（由 4h 增至 24h），或增加土壤质量 W（如由 0.1g 增至 0.2g 或更多）。则改变后的 T 和 W 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

酶活单位定义：在 37℃时，每克土壤样品每天催化产生 1 μg 甲臜物质为一个酶活性单位。

$$\text{S-DHA}(\mu\text{g/d/g 鲜土}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V1 \times 10^6 \times Mr) \div (W \times V1 \div V2) \div T = 169.2 \times \Delta A \div W$$

ϵ ---甲臜物质的摩尔消光系数， $3.1 \times 10^4 \text{ L/mol/cm}$ ； W---样品质量，g；

V1---96 孔板的检测总体积， $200\mu\text{L} = 0.2\text{mL} = 2 \times 10^{-4}\text{L}$ ； d---光径，0.5cm； T---培养时间，4h=1/6d；

V2---EP 管中反应总体积， $700\mu\text{L} = 0.7\text{mL}$ ； Mr---甲臜物质的分子量，624.47。