

土壤荧光素二乙酸酯（Fluorescein diacetate, FDA）水解酶试剂盒说明书 （微板法 96 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×2 瓶 | 4℃保存 | |
| 试剂二 | 粉体 mg×1 瓶 | 4℃保存 | 临用前加 6mL 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：

酶标仪、96 孔板、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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 490nm。

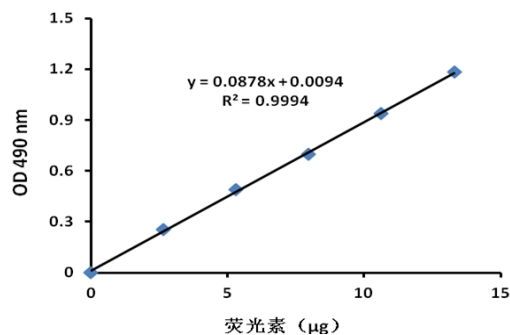
② 在 EP 管中依次加入：

| 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 200μL 至 96 孔板中，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： $y = 0.0878x + 0.0094$ ；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。

$$\text{FDA 活性}(\mu\text{g/h/g}) = (\Delta A - 0.0094) \div 0.0878 \div W \div T \times D = 11.39 \times (\Delta A - 0.0094) \div W \times D$$

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°C保存）。
- 2 把母液用试剂一稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2. 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。