

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

微量法 100T/48S

注 意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

FDA 水解反应能很好的反应土壤中微生物活性和土壤质量的变化以及生态系统中有机的转化，是土壤质量研究中的重要生物学指标之一。

测定原理：

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，稳定不易被分解，并在 490nm 处有强吸收峰，通过检测 490nm 处的吸光值变化可计算得 FDA 水解酶活性。

自备实验用品及仪器：

天平、低温离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、恒温水浴锅。

试剂组成和配制：

标准液：液体 4mL×1 瓶，4℃保存。

试剂一：液体 40mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：粉剂 1 瓶，-20℃避光保存，临用前加 4mL 试剂三溶解。

试剂三：液体 40mL×1 瓶，4℃保存。

样本处理：

称取风干过 30-50 目筛土壤约 0.1g，备用。

测定操作表:

	空白管	标准管	对照管	测定管
样本 (g)			0.05	0.05
标准液 (μL)		40		
双蒸水 (μL)	40			
试剂一 (μL)	200	200	240	200
试剂二 (μL)				40
充分混匀, 30℃, 震荡 1h				
试剂三 (μL)	160	160	160	160
10000g, 25℃, 离心 5min, 取 200μL 上清于微量石英比色皿/96 孔板中测定 490nm 处吸光值 A, $\Delta A1=A$ 标准管-A 空白管, $\Delta A2=A$ 测定管-A 对照管				

注 意: 空白管和标准管只需测定一次。

酶活性计算公式:

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

酶活性定义: 每克土壤每天产生 1 μ mol 荧光素的量为一个酶活力单位。

$$S-FDA \text{ 活性 } (\mu \text{ mol/d/g 土样}) = (\Delta A2 \div \Delta A1 \times C \text{ 标准品}) \times V \text{ 反应} \div W$$

$$= 0.96 \times (\Delta A2 \div \Delta A1) \div W$$

b.用 96 孔板测定的计算公式如下

酶活性定义: 每克土壤每天产生 1 μ mol 荧光素的量为一个酶活力单位。

$$S-FDA \text{ 活性 } (\mu \text{ mol/d/g 土样}) = (\Delta A2 \div \Delta A1 \times C \text{ 标准品}) \times V \text{ 反应} \div W$$

$$= 0.96 \times (\Delta A2 \div \Delta A1) \div W$$

C 标准品:

标准品浓度 $100 \mu\text{mol/L}$; V 反总: 反应总体积, 0.4mL ; W: 样本质量, g

注意事项:

1. 尽量采用新鲜土样或者短期低温保存样品, 否则很难准确反映酶的活性。
2. 测定之前进行预实验, 若吸光值较高, 请进行适当的稀释再测定, 并在计算公式中乘以稀释倍数。