

土壤 FDA 水解酶活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：AC10157

规格：100T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 50 mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂二	粉剂×1 瓶	-20℃ 保存
标准品	粉剂×1 瓶	-20℃ 保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加 2 mL 丙酮溶解；
- 2、标准品：10 mg 荧光素，临用前加入 3.03 mL 50%丙酮（丙酮（V）：蒸馏水（V）=1:1）配成 10 $\mu\text{mol/mL}$ 的荧光素标准溶液，可 45℃水浴促进溶解。

产品说明：

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有机质的转化，是土壤质量研究中的重要生物学指标之一。

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，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。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

天平、低温离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、恒温水浴锅、丙酮、研钵、30-50 目筛。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

新鲜土样自然风干或 37℃烘箱风干，过 30-50 目筛。

二、测定步骤

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长至 490nm，50%丙酮调零。
2. 将 10 $\mu\text{mol/mL}$ 的荧光素标准溶液用 50%丙酮稀释为 2、0 $\mu\text{mol/mL}$ 的标准溶液（0 为空白管）。分别吸取 200 μL 于比色皿/96 孔板中测定 490nm 下的吸光度 A 标准、A 空白，计算 ΔA 标准=A 标准-A 空白。
3. 样本测定

	对照管	测定管
样本（g）	0.03	0.03
试剂一（ μL ）	150	150

丙酮 (μL)	135	-
试剂二	15	15
充分混匀, 37°C, 震荡 1h		
丙酮 (μL)	-	135
10000g, 25°C, 离心 5min, 取 200μL 上清测定 490nm 处吸光值 A, 分别记为 A 测定、A 对照。计算 $\Delta A = A \text{ 测定} - A \text{ 对照}$ (空白管和标准管只需测定 1-2 次)。		

三、FDA 水解酶活性计算公式

酶活性定义: 每克土壤每天产生 1μmol 荧光素的量为一个酶活力单位。

FDA 活性 (U/g 土样) = $(\Delta A \div \Delta A \text{ 标准} \times C \text{ 标准品}) \times V \text{ 反应} \div W \div T = 14.4 \times (\Delta A \div \Delta A \text{ 标准}) \div W$

C 标准品: 标准品浓度 2μmol/mL; V 反应: 反应总体积, 0.3mL; W: 样本质量, g; T: 反应时间, 1h=1/24d。

注意事项:

1. 尽量采用新鲜土样或者短期低温保存样本, 否则很难准确反映酶的活性。
2. 测定之前进行预实验, 若吸光值大于 1.2, 可适当减少土样质量再测定。若吸光值过小, 可增加土样质量或增加反应时间来进行测定。

实验实例:

- 1、分别取 0.03g 三叶草土于 1.5mLEP 管中, 分别为对照管及测定管, 按照测定步骤操作, 取上清后稀释 4 倍进行测定, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A = A \text{ 测定} - A \text{ 对照} = 0.883 - 0.063 = 0.82$, $\Delta A \text{ 标准} = A \text{ 标准} - A \text{ 空白} = 0.275 - 0.044 = 0.231$, 按土壤质量计算酶活得:

FDA 活性 (U/g 土样) = $14.4 \times (\Delta A \div \Delta A \text{ 标准}) \div W \times 4 \text{ (稀释倍数)} = 14.4 \times (0.82 \div 0.231) \div 0.03 \times 4 \text{ (稀释倍数)}$
= 6815.584 U/g 土样。

- 2、分别取 0.03g 林土于 1.5mLEP 管中, 分别为对照管及测定管, 按照测定步骤操作, 取上清后稀释 4 倍进行测定, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A = A \text{ 测定} - A \text{ 对照} = 0.634 - 0.050 = 0.584$, $\Delta A \text{ 标准} = A \text{ 标准} - A \text{ 空白} = 0.275 - 0.044 = 0.231$, 按土壤质量计算酶活得:

FDA 活性 (U/g 土样) = $14.4 \times (\Delta A \div \Delta A \text{ 标准}) \div W \times 4 \text{ (稀释倍数)} = 14.4 \times (0.584 \div 0.231) \div 0.03 \times 4 \text{ (稀释倍数)}$
= 4854.026 U/g 土样。

参考文献:

[1] Sánchez-Monedero M A, Mondini C, Cayuela M L, et al. Fluorescein diacetate hydrolysis, respiration and microbial biomass in freshly amended soils[J]. Biology and Fertility of Soils, 2008, 44(6): 885-890.

[2] Paudel B R, Udawatta R P, Anderson S H. Agroforestry and grass buffer effects on soil quality parameters for grazed pasture and row-crop systems[J]. Applied Soil Ecology, 2011, 48(2): 125-132.