土壤亚硝酸还原酶（S-NiR）试剂盒说明书

(货号：ADS-W-TR031　微板法 48 样)

有效期：6 个月

一、产品简介：

土壤亚硝酸还原酶是反硝化作用的关键酶，它是由土壤反硝化细菌产生的一种还原类酶，参与亚硝酸盐至 NO 的还原反应，它的活性反映了生物降解过程中氮素的转化效率，为氮素转化规律的研究提供一定的依据。

土壤亚硝酸还原酶可将 NO2-还原为 NO，使样品中参与重氮化反应生成（粉）红色化合物的 NO2-减少，该（粉）红色物质在 540nm 有最大吸收峰，通过检测 540nm 处吸光值的变化来反应土壤亚硝酸还原酶的活性。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	有沉淀，临用前混匀即可
试剂二	粉体 3 瓶	4℃保存	每瓶临用前，加 20ml 蒸馏水混匀即可使用
试剂三	液体 22mL×1 瓶	4℃保存	试剂会出现过饱和，临用前 25℃水浴，5min 即可使用
试剂四	A 液 12mL×1 瓶	4℃保存	临用前，可依据待检测样本数量，把 A 液和 B 液等比例混合成**无色**的反应 mix **（注意观察，若变粉色，则不能使用）**。两天之内用完。
	B 液 12mL×1 瓶		
标准品	粉体 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、天平、水浴锅、低温离心机、可调式移液器。

四、土壤亚硝酸还原酶（S-NiR）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

取新鲜土样风干或者 37 度烘箱风干，先粗研磨，过 40 目筛网，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、测定步骤

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm。

② 在 EP 管中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	无基质对照管	无土对照管（仅做一次）
土样（g）	0.1	0.1	

试剂一	400		400
蒸馏水	800	1200	800
试剂二	500	500	500
混匀，且务必用封口膜封口，25℃，培养 24h			
试剂三	200	200	200
混匀，12000rpm，4℃离心 10min，上清液待用。			

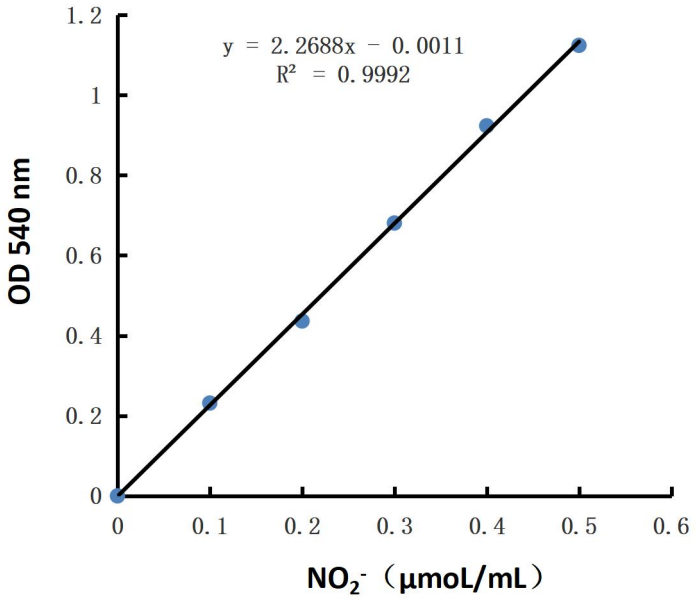
③ 显色反应，②步得到的上清液用蒸馏水稀释 50 倍后，在 96 孔板中依次加：

上清液	20	20	20
反应 mix	200	200	200
混匀，25℃反应 5min（准确时间），**立即**于 540nm 处读取 A 值，△A=A 无土对照管-（A 测定管-A 无基质对照管），（每个样本需做一个自身对照）。			

【注】：若△A 值低于 0.01，可增加土壤样本取样质量 W（如由 0.1g 增至 0.25g），则改变后的 W 需带入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程：y = 2.2688x - 0.0011；x 为标准品浓度（μmoL/mL），y 为吸光值△A。



2、单位定义：每克土壤每天还原 1μmoL 的 NO_2^-量为一个酶活力单位。

S-NiR(μmoL/d/g 土壤)=[(△A+0.0011)÷2.2688×V1]÷W÷T×D

=0.84×(△A+0.0011)÷W×50

3、单位定义：每克土壤每天还原 1μg 的 NO_2^-量为一个酶活力单位。

S- NiR(μg/d/g 土壤)=[(△A+0.0011)÷2.2688×V1]÷W÷T×46×D

=38.64×(△A+0.0011)÷W×50

V1---反应体系总体积，1900μL=1.9mL；　　T---反应时间，24h=1d；

W---土样实际质量，g；　　D---稀释倍数，50 倍；

标准品的分子量---69;　　NO_2^-的分子量---46。

附：标准曲线制作过程：

1　制备标准品母液（100μmol/mL）：把标准品完全溶解于 1mL 蒸馏水中（母液需在两天内用且-20℃保存）。

2　把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. μmol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。

3　依据显色反应阶段的测定管的加样顺序操作，根据结果即可制作标准曲线。