

土壤亚硝酸还原酶（Solid-Nitrite reductase, S-NiR）试剂盒说明书

(货号：ADS-F-TR031 分光法 24 样 有效期：6 个月)

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	粉体 1 瓶	4℃保存	1. 临用前，加 30ml 蒸馏水混匀即可使用； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 12mL×1 瓶	4℃保存	1. 试剂会出现过饱和，临用前 25℃水浴，5min 即可使用； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	A 液 21mL×1 瓶	4℃避光保存	1. 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 ）； 2. 两天之内用完。
	B 液 21mL×1 瓶		
标准品	粉体 1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取

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 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 540nm，蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入：

试剂组分（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			

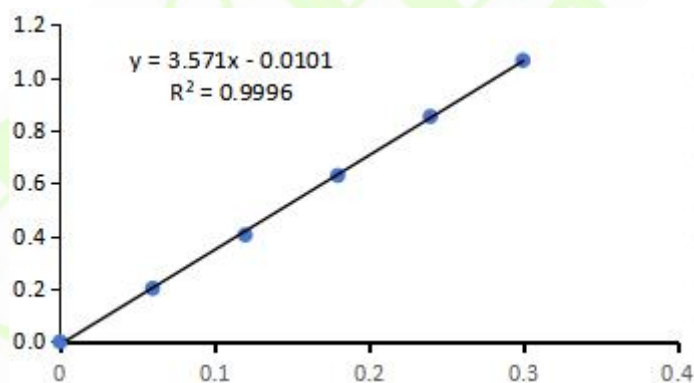
③ 显色反应, ②步得到的上清液用蒸馏水稀释 70 倍后, 在 EP 管中依次加:

上清液	70	70	70
反应 mix	700	700	700
混匀, 25℃反应 5min (准确时间), 取出全部澄清液体至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 立即于 540nm 处读取 A 值, $\Delta A = A_{\text{无土对照管}} - (A_{\text{测定管}} - A_{\text{无基质对照管}})$, (每个样本需做一个自身对照)。			

【注】: 若 ΔA 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: $y = 3.571x - 0.0101$; x 为标准品浓度 ($\mu\text{mol/mL}$), y 为吸光值 ΔA 。



2、单位定义: 每克土样每天还原 $1\mu\text{mol}$ 的 NO_2^- 量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{S-NiR } (\mu\text{mol/d/g 土壤}) &= [(\Delta A + 0.0101) \div 3.571 \times V1] \div W \div T \times D \\ &= 0.53 \times (\Delta A + 0.0101) \div W \times 70 \end{aligned}$$

3、单位定义: 每克土样每天还原 $1\mu\text{g}$ 的 NO_2^- 量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{S-NiR } (\mu\text{g/d/g 土壤}) &= [(\Delta A + 0.0101) \div 3.571 \times V1] \div W \div T \times 46 \times D \\ &= 24.5 \times (\Delta A + 0.0101) \div W \times 70 \end{aligned}$$

V1---反应体系总体积, $1900\mu\text{L}=1.9\text{mL}$;

T---反应时间, $24\text{h}=1\text{d}$;

W---土样实际质量, g;

D---稀释倍数, 70 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 把标准品完全溶解于 1mL 蒸馏水中 (母液需在两天内用且 -20°C 保存), 标准品母液浓度为 $100\mu\text{mol/mL}$ 。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 0.06, 0.12, 0.18, 0.24, 0.3 $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下:

1. 吸取标准品母液 100uL, 加入 900uL 蒸馏水, 混匀得到 10 μ mol/mL 的标品稀释液;						
2. 吸取 10 μ mol/mL 的标品稀释液 100uL, 加入 900uL 蒸馏水, 混匀得到 1 μ mol/mL 的标品稀释液;						
3. 吸取标准品母液 300uL, 加入 700uL 蒸馏水, 混匀得到 0.3 μ mol/mL 的标品稀释液待用;						
标品浓度 μ mol/mL	0	0.06	0.12	0.18	0.24	0.3
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据显色反应阶段测定管的加样表操作, 根据结果, 以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值, 过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	70	
蒸馏水		70
反应 mix	700	700
混匀, 25 $^{\circ}$ C 反应 5min (准确时间), 取出全部澄清液体至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 立即于 540nm 处读取 A 值, $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		