

土壤亚硝酸还原酶测试盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
SMHB2-M48	土壤亚硝酸还原酶(S-NiR)试剂盒	48T	微量法
SMHB2-M96		96T	

一、测定意义

土壤亚硝酸还原酶是土壤 N 素反硝化过程中的两种关键酶之一，其活性强弱影响着温室气体氮氧化物的排放，同时也受农田管理措施、自然或人为扰动、以及土壤条件如水分、温度、土壤质地的强烈影响。

二、测定原理

土壤亚硝酸还原酶将 NO₂ 还原为 NO，通过 NO₂-N 与格里试剂反应所产生的颜色深浅测定酶促反应前后 NO₂-N 变化用于表示亚硝酸还原酶活性。

三、试剂组成

试剂名称	试剂装量 (48T)	试剂装量 (96T)	保存条件
试剂一	6mL×1 瓶	12mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂一应用液的配制： 用时将试剂一用蒸馏水 20 倍稀释，现用现配			
试剂二	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	4℃ 保存
试剂二应用液的配制： 用时每支粉剂加入 6mL 蒸馏水，充分溶解，4 度保存			
试剂三	8mL×1 瓶	16mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂四	5mL×1 瓶	10mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂五	5mL×1 瓶	10mL×1 瓶	4℃ 保存
显色剂的配制： 将试剂四 (mL)：试剂五 (mL) = 1：1 等比例混合，现用现配			
标准品溶液 (10μmol/mL)	1.5mL×1 支	1.5mL×1 支	4℃ 保存

四、操作步骤

样本前处理

新鲜土样自然风干或者 37℃ 烘箱风干，过 30-50 目筛。

操作步骤

1、培养反应：

	无土基质管	测定管	对照管
土样 (g)	-	0.05	0.05
试剂一 (μL)	100	100	-
试剂二 (μL)	50	50	50
蒸馏水 (μL)	400	400	400
混匀，37℃ 孵育 12h			

试剂三 (μL)	50	50	50
----------	----	----	----

混匀，10000 转/min 常温离心 10min，取上清液备用。

2、显色反应：

	无土基质管	测定管	对照管	标准管
稀释后的上清液 (μL)	20	20	20	-
不同浓度的标准液 (μL)	-	-	-	20
显色剂 (μL)	40	40	40	40
蒸馏水 (μL)	140	140	140	140

混匀，室温静置 20min，波长 520nm，酶标仪测定各管吸光度值。

注：每个待测样本需设定一个测定管和一个对照管，无土基质管一批实验只需做一个；

五、单位定义与计算

单位定义：每天每克土壤还原 $1\mu\text{mol NO}_2^-$ 为一个酶活力单位

计算公式：根据标准曲线，将各管吸光度值带入标曲计算出上清液中浓度 $Y(\mu\text{mol/mL})$

$$S\text{-NiR}(U/g \text{ 土样}) = (Y_{\text{无土基质管}} - Y_{\text{测定管}} - Y_{\text{对照管}}) \times V_{\text{反应}} \div W \div T$$

T：反应时间，12h=1/2 d；

V_{反应}：反应体系总体积,0.6mL；

W：样本质量，0.05g。

六、注意事项

- 1、比色时，溶液呈现红色，在 2h 内保持稳定。
- 2、不同土壤样本的亚硝酸还原酶活性差异较大，先做预实验确认样本活力。可适当调整反应时间或者取样量，计算公式对应改变即可。

七、公司介绍

陌凡生物科技有限公司是一家专业从事转基因检测、食品安全以及动植物疫病检测为核心业务的生物科技公司。能够为客户提供动植物疫病检测试剂、小分子抗原抗体、植物激素、植物抗体、重组蛋白等优质产品。自主研发了涵盖分子生物学、细胞生物学、免疫学、生物医学等领域的各种试剂盒。产品覆盖面广，品质可靠。

附录 I：标准曲线的制备

1、前处理：

将 10 $\mu\text{mol/mL}$ 的标准品溶液用蒸馏水稀释成 0、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.4 $\mu\text{mol/mL}$ 氮标准液进行标准曲线的制备。

2、操作表：

标准液浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)	0	0.01	0.02	0.05	0.1	0.2	0.4
不同浓度的标准液 (μL)	20	20	20	20	20	20	20
显色剂 (μL)	40	40	40	40	40	40	40
蒸馏水 (μL)	140	140	140	140	140	140	140

混匀，室温静置 20min，波长 520nm，酶标仪测定各管吸光度值。

3、测定结果：

标准浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)	吸光度值	绝对吸光度值
0.00	0.0472	0.0000
0.01	0.0701	0.0229
0.02	0.0999	0.0527
0.05	0.1749	0.1277
0.10	0.2754	0.2282
0.20	0.4911	0.4439
0.40	0.9332	0.8860

