

## 土壤羟胺还原酶(S-HR)检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
SMHC7-C24	土壤羟胺还原酶(S-HR)检测试剂盒	24T	常量法

### 一、测定意义

土壤羟胺还原酶能将土壤中氮代谢过程中形成的中间产物羟胺还原为氨，土壤中的还原态化合物可作为氢的供体，其强弱影响到土壤氮代谢过程中氮素的氨挥发损失，间接影响氮肥的利用效率。

### 二、测定原理

硫酸铁铵中的  $Fe^{3+}$  可将羟胺氧化为氮气，自身被还原为  $Fe^{2+}$ ， $Fe^{2+}$  在弱酸条件下与邻菲罗啉形成橙红色配合物，在 510nm 处有吸收峰，羟胺还原酶作用于羟胺，使配合物形成量减少，510nm 处吸光值的减少可反映羟胺还原酶的活性。

### 三、试剂组成

试剂名称	试剂装量 (24T)	保存条件
试剂一	液体 15mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂二	粉剂×2 瓶	2-8℃ 保存
<b>试剂二：</b> 临用前取 1 瓶加入 7.5mL 蒸馏水充分溶解备用，2-8℃ 保存一周；		
试剂三	液体 50mL×1 瓶	2-8℃ 保存
<b>试剂三：</b> 临用前沸水浴中加热 15min，开盖 10s 后立即拧紧盖子，待自然冷却后再使用。		
试剂四	粉剂×2 瓶	2-8℃ 保存
<b>试剂四：</b> 临用前取一瓶加 10mL 蒸馏水溶解，此溶液为饱和溶液，取上清使用即可。		
试剂五	液体 15mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂六	液体 10mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂七	液体 10mL×1 瓶	2-8℃ 保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃ 保存
<b>标准品的配制：</b> 临用前加 1.028mL 蒸馏水充分溶解，制备 140 $\mu$ mol/mL 盐酸羟胺标准溶液待用，2-8℃ 保存 2 周。		

### 四、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 以上，调节波长至 510nm，分光光度计蒸馏水调零。

- 2、标准液的稀释：将 140 $\mu\text{mol/mL}$  标准液用蒸馏水稀释至 4.375、2.1875、1.094、0.547、0.2735、0.13675 $\mu\text{mol/mL}$  的标准液备用。

序号	稀释前浓度 ( $\mu\text{mol/mL}$ )	标准液体积 ( $\mu\text{L}$ )	蒸馏水体积 ( $\mu\text{L}$ )	稀释后浓度 ( $\mu\text{mol/mL}$ )
1	140	50	1550	4.375
2	4.375	500	500	2.1875
3	2.1875	500	500	1.094
4	1.094	500	500	0.547
5	0.547	500	500	0.2735
6	0.2735	500	500	0.13675

### 3、操作表

试剂名称	对照管	测定管	无基质管	标准管	空白管
风干土样 (g)	0.1	0.1	-	-	-
试剂一 ( $\mu\text{L}$ )	-	200	200	-	-
标准溶液 ( $\mu\text{L}$ )	-	-	-	200	-
蒸馏水 ( $\mu\text{L}$ )	200	-	-	-	200
试剂二 ( $\mu\text{L}$ )	200	200	200	200	200
试剂三 ( $\mu\text{L}$ )	600	600	600	600	600
混匀后，用氮气 (N <sub>2</sub> ) 流排除管中空气，立即密封，置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅反应 1h					
试剂四 ( $\mu\text{L}$ )	400	400	400	400	400
充分震荡 10min, 8000rpm, 25 $^{\circ}\text{C}$ , 离心 10min					
上清液 ( $\mu\text{L}$ )	100	100	100	100	100
试剂五 ( $\mu\text{L}$ )	200	200	200	200	200
试剂六 ( $\mu\text{L}$ )	100	100	100	100	100
试剂七 ( $\mu\text{L}$ )	100	100	100	100	100
蒸馏水 ( $\mu\text{L}$ )	500	500	500	500	500
充分混匀，置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅，显色 10min，于 1mL 玻璃比色皿中测定 510nm 处吸光值，记为 $A_{\text{对照管}}$ 、 $A_{\text{测定管}}$ 、 $A_{\text{无基质管}}$ 、 $A_{\text{标准管}}$ 和 $A_{\text{空白管}}$ 。计算 $\Delta A_{\text{测定}} = (A_{\text{无基质管}} - A_{\text{空白管}}) - (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}})$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。每个测定管需设一个对照管（标准曲线、无基质管和空白管只需做 1-2 次）					

## 五、土壤羟胺还原酶活性计算

### 1、标准曲线的绘制：

根据标准管的浓度 ( $x$ ,  $\mu\text{mol/mL}$ ) 和吸光度  $\Delta A_{\text{标准}}$  ( $y$ ,  $\Delta A_{\text{标准}}$ )，建立标准曲线。  
 根据标准曲线，将  $\Delta A_{\text{测定}}$  ( $y$ ,  $\Delta A_{\text{测定}}$ ) 带入公式计算样本浓度 ( $x$ ,  $\mu\text{mol/mL}$ )。

### 2、土壤羟胺还原酶活性的计算：

酶活定义：每克土壤每天转化  $1\mu\text{mol}$  羟胺为 1 个酶活力单位。

$$\text{S-HR (U/g 土样)} = x \times V_{\text{试剂}} \div W \div T = 4.8x \div W$$

$V_{\text{试剂}}$ ：加入试剂一体积，0.2mL；W：样本质量，g；T：反应时间 1/24d。

## 六、注意事项

- 1、土壤表层溶解氧浓度较大，取样应取表层 5cm 以下的土壤，否则酶活性较低或者测定不到。
- 2、当 $\Delta A$  大于 0.8 时，建议将样本上清液稀释后再进行测定。
- 3、反应体系最好能用氮吹仪排除溶解氧，若无此装置，则加入试剂三后立即密封，于  $30^{\circ}\text{C}$  反应 1h。

## 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。