

## 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、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 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 还原为 NO, 使样品中参与重氮化反应生成 (粉) 红色化合物的 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 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 30mL×1 瓶	4°C 避光保存	1. 有沉淀, 临用前混匀即可; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉体 3 瓶	4°C 保存	每瓶: 1. 临用前, 加 20ml 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 22mL×1 瓶	4°C 保存	1. 试剂会出现过饱和, 临用前 25°C 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 12mL×1 瓶	4°C 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 12mL×1 瓶		
标准品	粉体 1 支	4°C 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)、96 孔板、离心管、酶标仪、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 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°C，培养 24h			
试剂三	200	200	200
混匀，12000rpm，4°C离心 10min，上清液待用。			

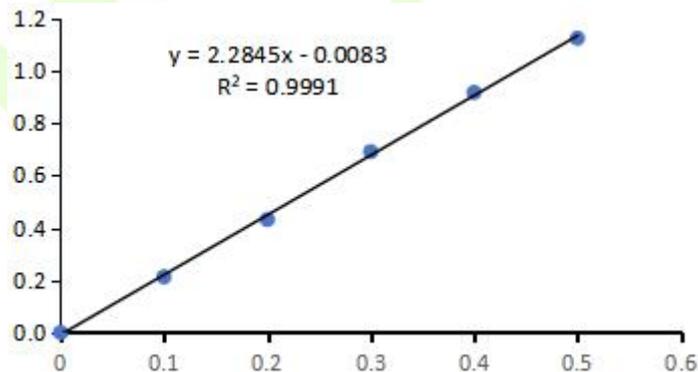
- ③ 显色反应，②步得到的上清液用蒸馏水稀释 50 倍后，在 96 孔板中依次加：

上清液	20	20	20
反应 mix	200	200	200
混匀，25°C反应 5min（准确时间），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  $\Delta A$  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： $y = 2.2845x - 0.0083$ ；x 为标准品浓度 ( $\mu\text{mol/mL}$ )，y 为吸光值  $\Delta A$ 。



- 2、单位定义：每克土壤每天还原  $1\mu\text{mol}$  的  $\text{NO}_2^-$  量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}
 \text{S-NiR}(\mu\text{mol/d/g 土壤}) &= [(\Delta A + 0.0083) \div 2.2845 \times V1] \div W \div T \times D \\
 &= 0.832 \times (\Delta A + 0.0083) \div W \times 50
 \end{aligned}$$

- 3、单位定义：每克土壤每天还原  $1\mu\text{g}$  的  $\text{NO}_2^-$  量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}
 \text{S-NiR}(\mu\text{g/d/g 土壤}) &= [(\Delta A + 0.0083) \div 2.2845 \times V1] \div W \div T \times 46 \times D \\
 &= 38.26 \times (\Delta A + 0.0083) \div W \times 50
 \end{aligned}$$

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，50 倍；

标准品的分子量---69;

NO<sub>2</sub>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℃保存），标准品母液浓度为 100μmol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. μmol/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 50uL，加入 950uL 蒸馏水，混匀得到 5μmol/mL 的标品稀释液；						
2. 吸取 5μmol/mL 的标品稀释液 100uL，加入 900uL 蒸馏水，混匀得到 0.5μmol/mL 的标品稀释液待用；						
标品浓度 μmol/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
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 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	20	
蒸馏水		20
反应 mix	200	200
混匀，25℃反应 5min（准确时间），立即于 540nm 处读取 A 值， $\Delta A=A$ 测定-0 浓度管。		