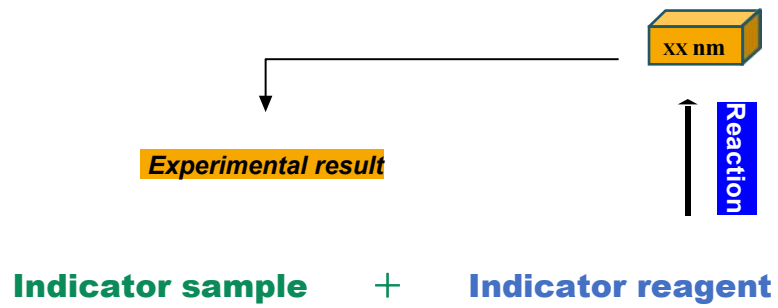


上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

## 土壤亚硝酸还原酶（S-NiR）试剂盒说明书

### 微量法

**注意：**正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

#### 测定意义

土壤亚硝酸还原酶是反硝化作用中的关键酶之一，参与亚硝酸盐至 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。

#### 测定原理

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紫红色化合物的NO<sub>2</sub><sup>-</sup>减少，即540nm处吸光值的变化可反应土壤中亚硝酸还原酶的活性。

#### 需自备的仪器和用品

天平、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板、水浴锅、低温离心机。

#### 试剂的组成和配制

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 4mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加4mL蒸馏水溶解
试剂三	液体 4mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂四	液体 6mL×1 瓶	4℃避光保存	-
试剂五	液体 6mL×1 瓶	4℃保存	-
工作液	临用前根据用量将试剂四和试剂五以 1:1 的比例混合		

#### 测定操作表

	空白管	对照管	测定管
风干土样 (g)		0.02	0.02
蒸馏水 (μL)		40	
试剂一 (μL)	40		40
试剂二 (μL)	40	40	40
混匀后，25℃反应 1h			
试剂三 (μL)	40	40	40
充分震荡 30S，10000rpm，4℃，离心 10min			
上清液 (μL)	100	100	100
工作液 (μL)	50	50	50

充分混匀，室温静置显色 20min，于微量石英比色皿/96孔板中测定540nm 各管吸光值，分别记为 A 空白管、A 对照管、A 测定管。

### 计算公式

#### a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线:  $y=0.0129x-0.0106$ ,  $R^2=0.9985$

酶活单位定义: 每g土样每24h还原 $1\mu\text{mol NO}_2^-$  的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} S\text{-NiR } (\mu\text{mol/d /g}) &= [A \text{ 空白管} - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) + 0.0106] \div 0.0129 \times V \text{ 反总} \div W \div T \\ &= 186.05 \times [A \text{ 空白管} - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) + 0.0106] \div W \end{aligned}$$

V 反总: 反应体系总体积, 0.1mL; T: 反应时间, 1h=1/24d; W: 样本质量, g。

#### b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线:  $y=0.0065x-0.0106$ ,  $R^2=0.9985$

酶活单位定义: 每g土样每24h还原 $1\mu\text{mol NO}_2^-$  的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} S\text{-NiR } (\mu\text{mol/d /g}) &= [A \text{ 空白管} - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) + 0.0106] \div 0.0065 \times V \text{ 反总} \div W \div T \\ &= 369.23 \times [A \text{ 空白管} - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) + 0.0106] \div W \end{aligned}$$

V 反总: 反应体系总体积, 0.1mL; T: 反应时间, 1h=1/24d; W: 样本质量, g。

### 注意事项

配制好的试剂二和工作液3天内使用完。