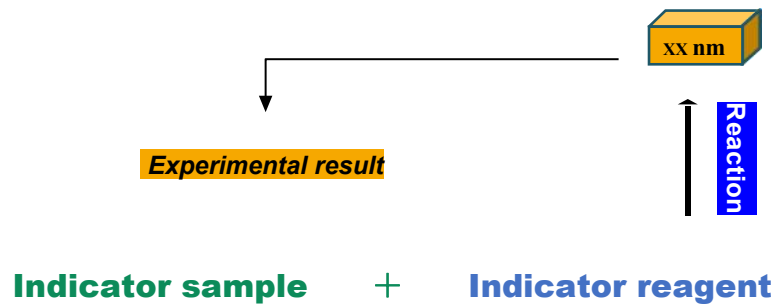


上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

## 土壤亚硝酸还原酶 (S-NiR) 活性检测试剂盒说明书

### 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。

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系工作人员。

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	粉剂×1 支	2-8℃保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	2-8℃保存	
试剂三	粉剂×1 瓶	2-8℃保存	
试剂四	液体 15mL×1 瓶	2-8℃保存	
试剂五	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃保存	
标准品	液体 1mL×1 支	2-8℃保存	

溶液的配制：

- 1、试剂一：临用前加入 1mL 蒸馏水充分溶解，2-8℃保存 2 周。临用前根据用量用蒸馏水稀释 100 倍，现用现配；
- 2、试剂二：临用前加 15mL 蒸馏水备用，2-8℃保存 2 周；
- 3、试剂三：临用前加 15mL 蒸馏水溶解，此溶液为饱和溶液，取上清使用即可。用不完的试剂 2-8℃保存 2 周；
- 4、标准品：10 μmol/mL 亚硝酸钠标准液。

**产品说明：**

土壤亚硝酸还原酶 (Solid-Nitrite reductase, S-NiR) 是反硝化作用中的关键酶之一，它是由土壤反硝化细菌产生的一种还原酶类，可将 $\text{NO}_2^-$ 还原为 $\text{NO}$ ，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。

亚硝酸还原酶可将 $\text{NO}_2^-$ 还原为 $\text{NO}$ ，使样本中参与重氮化反应生成紫红色化合物的 $\text{NO}^-$ 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。

S-NiR

$\text{NO}_2 \longrightarrow \text{NO}$

$\text{NO}_2 \xrightarrow{\text{4-Aminobenzenesulfonic Acid}} \text{Diazonium Salt} \xrightarrow{\text{N-(1-Naphthyl)-Ethylendiamine}} \text{Red Azo Dyes(540nm)}$

**注意：**实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

**需自备的仪器和用品：**

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、30-50目筛、研钵、冰和蒸馏水。

**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°C烘箱烘干，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540nm，分光光度计蒸馏水调零。
- 2、标准液的稀释：将标准液用蒸馏水稀释至0.8、0.6、0.4、0.2、0.1、0.05  $\mu\text{mol/mL}$ 的标准液。

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	10	100	900	1
2	1	160	40	0.8
3	1	120	80	0.6
4	1	200	300	0.4
5	0.4	200	200	0.2
6	0.2	200	200	0.1
7	0.1	200	200	0.05

备注：实验中每个标准管需 100 $\mu\text{L}$  标准溶液。

### 3、样本测定：

试剂名称	无基质管	空白管1	对照管	测定管	标准管	空白管2
风干土样 (g)	-	-	0.05	0.05	-	-
蒸馏水 (μL)	-	100	100		-	-
试剂一 (μL)	100	-		100	-	-
试剂二 (μL)	100	100	100	100	-	-
充分混匀后, 25°C水浴准确反应3h						
试剂三 (μL)	100	100	100	100	-	-
漩涡震荡30s, 10000rpm, 4°C, 离心10min						
上清液 (μL)	100	100	100	100	-	-
标准品 (μL)	-	-	-	-	100	-
试剂四 (μL)	100	100	100	100	100	100
试剂五 (μL)	100	100	100	100	100	100
蒸馏水 (μL)	-	-	-	-	-	100

充分混匀, 室温放置15min后吸取200 μL于微量玻璃比色皿或96孔板中, 测定540nm各管吸光值, 分别记为A无基质管、A空白管1、A对照管、A测定管、A标准管和A空白管2, 计算 $\Delta A_{测定} = (A_{无基质管} - A_{空白管1}) - (A_{测定管} - A_{对照管})$ ,  $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管2}$  (标准曲线、无基质管、空白管1、空白管2只需做1-2次)。

### 三、S-NiR 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  $\Delta A_{标准}$  ( $y$ ,  $\Delta A_{标准}$ ), 建立标准曲线。根据标准曲线, 将  $\Delta A_{测定}$  ( $y$ ,  $\Delta A_{测定}$ ) 带入公式计算样本浓度 ( $x$ ,  $\mu\text{mol/mL}$ )。

#### 2. S-NiR的计算：

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

力单位。S-NiR (U/g 土样) =  $x \times V_{反应} \div W \div T = 2.4 \times x \div W$

T: 反应时间, 3h=1/8d; V反应: 反应体系体积, 0.3mL; W: 土样质量, g。