

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0562

Size: 100T/48S

土壤亚硝酸还原酶检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

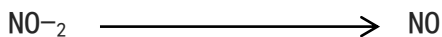
一、测定意义：

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 NO_2^- 还原为 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。

二、测定原理：

亚硝酸还原酶可将 NO_2^- 还原为 NO ，使样本中参与重氮化反应生成紫红色化合物的 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



4-Aminobenzenesulfonic Acid

N-(1-Naphthyl)-Ethylenediamine



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。

三、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。

四、试剂的组成和配置：

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 $\mu\text{mol/mL}$ 亚硝酸钠标准液。

五、操作步骤：

- 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℃烘箱烘干，过 30-50 目筛。

- 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 (μL)	蒸馏水体积 (μL)	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 μL 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 $^{\circ}\text{C}$ 水浴准确反应 3h						
试剂三 (μL)	100	100	100	100	—	—
	旋涡震荡 30s, 10000rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 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 ΔA 测定 = (A 无基质管 - A 空白管 1) - (A 测定管 - A 对照管)， ΔA 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)。

六、S-NiR 计算

● 标准曲线的绘制：

根据标准管的浓度 (x, μmol/mL) 和吸光度 ΔA 标准 (y, ΔA 标准)，建立标准曲线。

根据标准曲线，将 ΔA 测定 (y, ΔA 测定) 带入公式计算样本浓度 (x, μmol/mL)。

● S-NiR 的计算：

酶活单位定义：每 g 土样每天还原 1 μmol NO_2^- 的量为一个酶活力单位。

$$\text{S-NiR (U/g 土样)} = x \times V \text{ 反应} \div W \div T = 2.4 \times x \div W$$

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。