

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

土壤羟胺还原酶（HR）检测试剂盒说明书

可见分光光度法

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

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氨的供体，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。

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琳形成橙红色配合物，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。

自备实验用品及仪器

天平、常温离心机、可见分光光度计、1mL玻璃比色皿、震荡仪、氮吹仪。

试剂组成和配制

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加10mL蒸馏水充分溶解
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂四	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂五	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂六	液体 5mL×1 瓶	4℃避光保存	-
试剂七	液体 5mL×1 瓶	4℃避光保存	-

测定操作表

	空白管	对照管	测定管
风干土样 (g)		0.1	0.1
试剂一 (μL)	200		200
蒸馏水 (μL)		200	
试剂二 (μL)	200	200	200
试剂三 (μL)	600	600	600
混匀后, 用 N ₂ 气流排除管中空气, 立即密封, 于 30°C 反应 1h			
试剂四 (μL)	400	400	400
充分震荡 10min, 8000rpm, 25°C, 离心 10min			
上清液 (μL)	100	100	100
试剂五 (μL)	200	200	200
试剂六 (μL)	100	100	0.1
试剂七 (μL)	0.1	0.1	0.1
蒸馏水 (μL)	0.5	0.5	0.5
充分混匀, 25°C 静置显色 10min, 用蒸馏水调零, 于 1mL 玻璃比色皿中测定 510nm 各管吸光值, 分别记为 A 空白管、A 标准管、A 对照管、A 测定管, $\Delta A = A \text{ 空白管} - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管})$ 。			

计算公式

标准曲线: $y = 0.185x - 0.1828$, $R^2 = 0.9992$

酶活定义: 每克土壤每天转化 1 μg 羟胺为一个酶活力单位。

$$\text{HR 活性 } (\mu\text{g/d/g}) = (\Delta A + 0.1828) \div 0.185 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 1816.32 \times (\Delta A + 0.1828) \div W$$

V 反总: 反应总体积, 1mL; V 样: 反应体系中加入样本体积, 0.1mL; V 样总: 加入提取液体积, 1.4mL; W: 样本质量, g; T: 24h

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. 试剂三尽量不要敞口放置, 取完立即加盖拧紧。
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°C 反应 1h。