

土壤亚硝酸还原酶（Solid-Nitrite reductase, S-NiR）试剂盒说明书

微量法100T/48S

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NO₂⁻还原为NO，使样品中参与重氮化反应生成紫红色化合物的NO₂⁻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

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。（如出现沉淀可以70-80℃加热溶解）

试剂四：液体10mL×1瓶，4℃避光保存。（如出现沉淀可以70-80℃加热溶解）

试剂五：液体10mL×1瓶，4℃避光保存。

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。

样品处理

新鲜土样自然风干或37度烘箱风干，过30~50目筛。

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°C, 离心10min			
上清液 (μL)	70	70	70
工作液 (μL)	140	140	140
充分混匀, 静置3min后测定540nm处吸光值, 分别记为A空白管、A对照管、A测定管。空白管只要做一管, 每个测定管需设一个对照管。			

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: $y = 1.5562x + 0.0088$, $R^2 = 0.996$; x 为标准品浓度 ($\mu\text{mol/mL}$), y 为吸光值 (A标准管-A空白管)。

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。

$$\text{S-NiR } (\mu\text{mol/d/g土样}) = [\text{A空白管} - (\text{A测定管} - \text{A对照管}) - 0.0088] \div 1.5562 \times V_{\text{标}} \div W \div T$$

$$= 0.617 \times [\text{A空白管} - (\text{A测定管} - \text{A对照管}) - 0.0088] \div W$$

T: 反应时间, $1\text{h} = 1/24\text{d}$; $V_{\text{标}}$: 标准液体积, 0.04mL ; 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: $y = 0.7781x + 0.0088$, $R^2 = 0.996$; x 为标准品浓度 ($\mu\text{mol/mL}$), y 为吸光值 (A标准管-A空白管)。

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。

$$\text{S-NiR } (\mu\text{mol/d/g土样}) = [\text{A空白管} - (\text{A测定管} - \text{A对照管}) - 0.0088] \div 0.7781 \times V_{\text{标}} \div W \div T$$

$$= 1.234 \times [\text{A空白管} - (\text{A测定管} - \text{A对照管}) - 0.0088] \div W$$

T: 反应时间, $1\text{h} = 1/24\text{d}$; $V_{\text{标}}$: 标准液体积, 0.04mL ; W: 样本质量, g。

注意事项

1. 配制好的工作液3天内使用完。
2. 若吸光值超过1.5, 将上清液进行适当的稀释后再加入工作液显色, 并在计算公式中乘以稀释倍数。
3. 严格控制显色时间, 否则会对结果有影响。
4. 标准曲线线性范围为 $0.03\mu\text{mol/mL}$ - $1.5\mu\text{mol/mL}$ 。
5. A空白管- (A测定管-A对照管) 线性范围为0.02-1.5。