

## 土壤亚硝酸还原酶（Solid-Nitrite reductase, S-NiR）试剂盒说明书 (微板法 48 样)

### 一、产品简介：

土壤亚硝酸还原酶是反硝化作用的关键酶，它是由土壤反硝化细菌产生的一种还原类酶，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。

土壤亚硝酸还原酶可将 NO<sub>2</sub>-还原为 NO，使样品中参与重氮化反应生成（粉）红色化合物的 NO<sub>2</sub>-减少，该（粉）红色物质在 540nm 有最大吸收峰，通过检测 540nm 处吸光值的变化来反应土壤亚硝酸还原酶的活性。

### 二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 55mL×1 瓶	4°C保存	有沉淀，临用前混匀即可
试剂三	液体 22mL×1 瓶	4°C保存	试剂会出现过饱和，临用前 25°C水浴，5min 即可使用
试剂四	A 液 12mL×1 瓶	4°C保存	临用前，可依据待检测样本数量，把 A 液和 B 液等比例混合成无色的反应 mix（注意观察，若变粉色，则不能使用）。两天之内用完。
	B 液 12mL×1 瓶		
标准品	粉体 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲，则用到该试剂

### 三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、天平、水浴锅、低温离心机、可调式移液器。

### 四、土壤亚硝酸还原酶（S-NiR）的测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

#### 1、样本制备

取新鲜土样风干或者 37 度烘箱风干，先粗研磨，过 40 目筛网，备用。

【注】：土壤风干，减少土壤中水分对于实验的干扰；土壤过筛，保证取样的均匀细腻；

#### 2、测定步骤

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm。

② 在 EP 管中依次加入：

试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）	测定管	无基质对照管	无土对照管 (仅做一次)
土样（g）	0.1	0.1	
试剂一	400		400
蒸馏水	800	1200	800
试剂二	500	500	500
混匀，且务必用封口膜封口，25°C，培养 24h			
试剂三	200	200	200

混匀，12000rpm，4℃离心 10min，上清液待用。

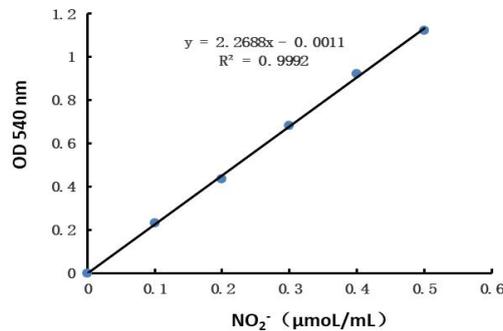
③ 显色反应，②步得到的上清液用蒸馏水稀释 50 倍后，在 96 孔板中依次加：

上清液	20	20	20
反应 mix	200	200	200
混匀，25℃反应 5min(准确时间)，立即于 540nm 处读取 A 值， $\Delta A = A$ 无土对照管 - (A 测定管 - A 无基质对照管)，(每个样本需做一个自身对照)。			

【注】：若  $\Delta A$  值低于 0.01，可增加土壤样本取样质量 W (如由 0.1g 增至 0.25g)，则改变后的 W 需带入公式重新计算。

## 五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 2.2688x - 0.0011$ ；x 为标准品浓度 ( $\mu\text{mol/mL}$ )，y 为吸光值  $\Delta A$ 。



2、单位定义：每克土壤每天还原  $1\mu\text{mol}$  的  $\text{NO}_2^-$  量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{S-NiR}(\mu\text{mol/d/g 土壤}) &= [(\Delta A + 0.0011) \div 2.2688 \times V1] \div W \div T \times D \\ &= 0.84 \times (\Delta A + 0.0011) \div W \times 50 \end{aligned}$$

3、单位定义：每克土壤每天还原  $1\mu\text{g}$  的  $\text{NO}_2^-$  量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{S-NiR}(\mu\text{g/d/g 土壤}) &= [(\Delta A + 0.0011) \div 2.2688 \times V1] \div W \div T \times 46 \times D \\ &= 38.64 \times (\Delta A + 0.0011) \div W \times 50 \end{aligned}$$

V1---反应体系总体积， $1900\mu\text{L} = 1.9\text{mL}$ ；

T---反应时间， $24\text{h} = 1\text{d}$ ；

W---土样实际质量，g；

D---稀释倍数，50 倍；

标准品的分子量---69；

$\text{NO}_2^-$  的分子量---46。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液 ( $100\mu\text{mol/mL}$ )：把标准品完全溶解于 1mL 蒸馏水中 (母液需在两天内用且  $-20^\circ\text{C}$  保存)。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5.  $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据显色反应阶段的测定管的加样顺序操作，根据结果即可制作标准曲线。