

土壤亚硝酸还原酶 (S-NiR) 检测试剂盒 (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。

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 NO_2^- 还原为 NO，使样品中参与重氮化反应生成紫红色化合物的 NO_2^- 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。

试剂组成和配制：

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℃ 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。

测定步骤：

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm，蒸馏水调零。

2、样本测定

	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℃，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。

$$\begin{aligned} \text{S-NiR } (\mu\text{mol /d /g 土样}) &= [\text{A 空白管} - (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) - 0.0088] \div 1.5562 \times V_{\text{标}} \div W \div T \\ &= 0.617 \times [\text{A 空白管} - (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) - 0.0088] \div W \end{aligned}$$

T: 反应时间, 1h=1/24d;

V 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。

$$\begin{aligned} \text{S-NiR } (\mu\text{mol /d /g 土样}) &= [\text{A 空白管} - (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) - 0.0088] \div 0.7781 \times V_{\text{标}} \div W \div T \\ &= 1.234 \times [\text{A 空白管} - (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) - 0.0088] \div W \end{aligned}$$

T: 反应时间, 1h=1/24d;

V 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。