

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

分光光度法 50 管/24 样

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。

需自备的仪器和用品：

天平、可见分光光度计、水浴锅、低温离心机、1mL 玻璃比色皿。

试剂的组成和配制：

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 蒸馏水溶解。

试剂三：液体 10mL×1 瓶，4℃ 保存。（如出现沉淀可以 70-80℃ 加热溶解）

试剂四：液体 25mL×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 25mL×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)		0.1	0.1
蒸馏水 (μL)		200	
试剂一 (μL)	200		200
试剂二 (μL)	200	200	200
混匀后，25℃ 反应 1h			
试剂三 (μL)	200	200	200
充分震荡 30S，10000rpm，4℃，离心 10min			
上清液 (μL)	500	500	500
工作液 (μL)	1000	1000	1000

充分混匀，用蒸馏水调零，静置 3min 后测定 540nm 处各管吸光值，分别记为 A 空白管、A 对照管、A 测定管。

计算公式：

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。

$$\begin{aligned} \text{S-NiR } (\mu\text{mol/d/g 土样}) &= [\text{A 空白管} - (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) - 0.0088] \times V_{\text{标}} \div 1.5562 \div W \div T \\ &= 3.084 \times [\text{A 空白管} - (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) - 0.0088] \div W \end{aligned}$$

T：反应时间，1h=1/24d； V 标：标准液体积，0.2mL； 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 3，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 0.02-3。