

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 (μmol/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 1μmol NO₂⁻ 的量为一个酶活力单位。

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

$$= 3.084 \times [A \text{ 空白管} - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) - 0.0088] \div W$$

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 0.03μmol/mL-1.5μmol/mL。
5. A 空白管-(A 测定管-A 对照管) 线性范围为 0.02-3。