

土壤羟胺还原酶 (S-HR) 活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号: AC10538

规格: 50T/24S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 15 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	4°C保存
试剂三	液体 50 mL×1 瓶	4°C保存
试剂四	液体 30 mL×1 瓶	4°C保存
试剂五	液体 15 mL×1 瓶	4°C保存
试剂六	液体 10 mL×1 瓶	4°C保存
试剂七	液体 10 mL×1 瓶	4°C保存
标准品	粉剂×1 支	4°C保存

溶液的配制:

- 1、试剂二: 临用前加入 15 mL 蒸馏水充分溶解备用;
- 2、标准品: 临用前加入 1.028 mL 蒸馏水充分溶解, 制备 140 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 盐酸羟胺标准溶液待用。

产品说明:

土壤羟胺还原酶能将土壤中氮代谢过程中形成的中间产物羟胺还原为氨, 土壤中的还原态化合物可作为氢的供体, 其强弱影响到土壤氮代谢过程中氮素的氨挥发损失, 间接影响氮肥的利用效率。

硫酸铁铵中的 Fe^{3+} 可将羟胺氧化为氮气, 自身被还原为 Fe^{2+} , Fe^{2+} 在弱酸条件下与邻菲罗啉形成橙红色配合物, 在 510nm 处有吸收峰, 羟胺还原酶作用于羟胺, 使配合物形成量减少, 510nm 处吸光值的减少可反映羟胺还原酶的活性。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、天平、台式离心机、1mL玻璃比色皿、可调式移液枪、30-50目筛、漩涡震荡仪、氮吹仪、研钵、EP管和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

新鲜土样自然风干或 37°C 烘箱烘干, 过 30-50 目筛。

二、测定步骤

- 1、分光光度预热 30min 以上, 调节波长至 510nm, 蒸馏水调零。
- 2、标准液的稀释: 将 140 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 标准液用蒸馏水稀释至 4.375、2.1875、1.094、0.547、0.2735、0.13675 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 的标准液备用。

3、样本测定（在1.5mLEP管中依次加入下列试剂）

	对照管	测定管	无基质管	标准管	空白管
风干土样（g）	0.1	0.1	-	-	-
试剂一（μL）	-	200	200	-	-
标准溶液（μL）	-	-	-	200	-
蒸馏水（μL）	200	-	-	-	200
试剂二（μL）	200	200	200	200	200
试剂三（μL）	600	600	600	600	600
混匀后，用氮气（N ₂ ）流排除管中空气，立即密封，于30°C反应1h					
试剂四（μL）	400	400	400	400	400
充分震荡10min，8000rpm，25°C，离心10min					
上清液（μL）	100	100	100	100	100
试剂五（μL）	200	200	200	200	200
试剂六（μL）	100	100	100	100	100
试剂七（μL）	100	100	100	100	100
蒸馏水（μL）	500	500	500	500	500
充分混匀，25°C静置显色10min，于1mL玻璃比色皿中测定510nm处吸光值，记为A对照管、A测定管、A无基质管、A标准管和A空白管。计算 $\Delta A = (A \text{无基质管} - A \text{空白管}) - (A \text{测定管} - A \text{对照管})$ ， $\Delta A \text{标准} = A \text{标准管} - A \text{空白管}$ 。每个测定管需设一个对照管（无基质管和空白管需做1-2次）。					

三、土壤羟胺还原酶活性计算

1、标准曲线的绘制：

以各个标准溶液的浓度为 x 轴，其对应的 ΔA 标准为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 代入方程得到 x（ $\mu\text{mol/mL}$ ）。

2、土壤羟胺还原酶活性的计算：

酶活定义：每克土壤每天转化 $1\mu\text{mol}$ 羟胺为 1 个酶活力单位。

S-HR 活性（U/g 土样）= $x \times V \text{ 试剂一} \div W \div T = 4.8x \div W$

V 试剂一：加入试剂一体积，0.2mL；W：样本质量，g；T：反应时间 1/24h。

注意事项：

1. 土壤表层溶解氧浓度较大，取样应取表层 5cm 以下的土壤，否则酶活性较低或者测定不到。
2. 试剂三尽量不要敞口放置，取完立即加盖拧紧。若长期敞口放置，可以沸水浴 10min（盖盖儿）冷却至常温使用。
3. 当 ΔA 大于 0.8 时，建议将样本上清液稀释后再进行测定。
4. 反应体系最好能用氮吹仪排除溶解氧，若无此装置，则加入试剂三后立即密封，于 30°C 反应 1h。

实验实例：

- 1、取 2 管 0.1g 三叶草土，按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A = (A \text{无基质管} - A \text{空白管}) - (A \text{测定管} - A \text{对照管}) = 0.603 - (0.499 - 0.139) = 0.243$ ，标准曲线： $y = 0.1693x + 0.0083$ ， $x = 1.3863$ ，按土壤重量计算 S-HR 酶活得：
S-HR 活性（U/g 土样）= $4.8 \times x \div W = 4.8 \times 1.3863 \div 0.1 = 66.542$ U/g 土样。

2、取 2 管 0.1g 林土，按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A = (A_{\text{无基质管}} - A_{\text{空白管}}) - (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) = 0.603 - (0.543 - 0.199) = 0.259$ ，标准曲线： $y = 0.1693x + 0.0083$ ， $x = 1.4808$ ，按土壤重量计算 S-HR 酶活得：
S-HR 活性 (U/g 土样) $= 4.8 \times x \div W = 4.8 \times 1.4808 \div 0.1 = 71.078$ U/g 土样。