

土壤亚硝酸还原酶（S-NiR）活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC2995

规格：100T/48S

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 7 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 12 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	液体 12 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1mL×1 支	2-8℃保存

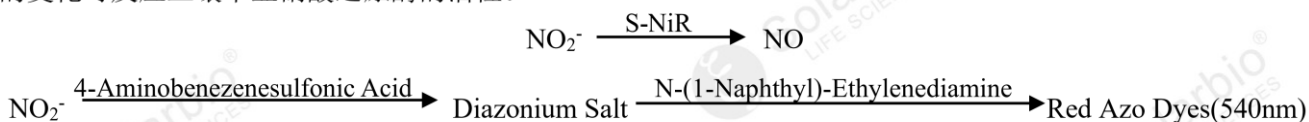
溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加 11mL 蒸馏水，充分溶解，2-8℃保存 4 周；
- 2、试剂三：临用前加 15mL 蒸馏水，充分溶解，此溶液为饱和溶液，取上清使用即可。用不完的试剂 2-8℃保存 4 周；
- 3、试剂五：若试剂有结晶析出，可 50℃水浴加热溶解。
- 4、显色液：临用前根据样本数量按照试剂四：试剂五=100μL：100μL（200μL，1T）的比例配制显色液，现用现配；
- 5、标准品：10μmol/mL 亚硝酸钠标准品。临用前取 40μL 10μmol/mL 标准品，加入 960μL 蒸馏水，配制成 0.4μmol/mL 标准品，现用现配。

产品说明：

土壤亚硝酸还原酶（Solid-Nitrite reductase, S-NiR）是反硝化作用中的关键酶之一，它是由土壤反硝化细菌产生的一种还原酶类，可将NO₂⁻还原为NO，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。

亚硝酸还原酶可将NO₂⁻还原为NO，使样本中参与重氮化反应生成紫红色化合物的NO₂⁻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。



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/酶标仪、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、30-50目筛、研钵、





冰和蒸馏水。

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℃烘箱烘干，过 30-50 目筛。

二、测定步骤

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

2、样本测定:

试剂名称	无基质管	空白管1	对照管	测定管	标准管	空白管2
风干土样 (g)	-	-	0.05	0.05	-	-
蒸馏水 (μL)	-	100	100	-	-	-
试剂一 (μL)	100	-	-	100	-	-
试剂二 (μL)	100	100	100	100	-	-
充分混匀后，25℃水浴准确反应3h					-	-
试剂三 (μL)	100	100	100	100	-	-
旋涡震荡30s，10000rpm，4℃，离心10min					-	-
上清液 (μL)	50	50	50	50	-	-
标准品 (μL)	-	-	-	-	50	-
蒸馏水 (μL)	-	-	-	-	-	50
显色液 (μL)	200	200	200	200	200	200

充分混匀，25℃放置15min后吸取200μL于微量玻璃比色皿或96孔板中，测定540nm各管吸光值，分别记为A无基质管、A空白管1、A对照管、A测定管、A标准管和A空白管2，计算 $\Delta A_{\text{测定}} = (A_{\text{无基质管}} - A_{\text{空白管1}}) - (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}})$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管2}}$ 。（标准管、无基质管、空白管1、空白管2只需做1-2次）。

三、S-NiR 活性计算

酶活单位定义：每g土样每天还原1μmol NO₂ 的量为一个酶活性单位。

S-NiR活性 (U/g 土样) = $(\Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times C_{\text{标准}}) \times V_{\text{反应}} \div W \div T = 0.96 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W$

C标准：标准品浓度，0.4μmol/mL；V反应：离心前反应体系体积，0.3mL；T：反应时间，3h=1/8d；W：土样质量，g。

实验实例:

1、取 0.103g 风干过筛的野蘑菇生境土壤样本，按照测定步骤操作，使用 96 孔板测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = (A_{\text{无基质管}} - A_{\text{空白管1}}) - (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) = (0.934 - 0.048) - (0.899 - 0.103) = 0.090$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管2}} = 0.797 - 0.050 = 0.747$ ，按样本质量计算：

S-NiR 活性 (U/g 土样) = $0.96 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 1.123$ U/g 土样。

2、取 0.100g 风干过筛的槐树生境土壤样本，按照测定步骤操作，使用 96 孔板测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = (A_{\text{无基质管}} - A_{\text{空白管1}}) - (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) = (0.934 - 0.048) - (0.880 - 0.111) = 0.117$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管2}} = 0.797 - 0.050 = 0.747$ ，按样本质量计算：

S-NiR 活性 (U/g 土样) = $0.96 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 1.504$ U/g 土样。



相关发表文献:

- [1] Li M, Chen Y, Feng Y, Li X, Ye L, Jiang J. Ecological Responses of Maize Rhizosphere to Antibiotics Entering the Agricultural System in an Area with High Arsenicals Geological Background. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Oct 19;19(20):13559. doi: 10.3390/ijerph192013559. PMID: 36294139; PMCID: PMC9603512.
- [2] Fazal A, Yang M, Wang X, Lu Y, Yao W, Luo F, Han M, Song Y, Cai J, Yin T, Niu K, Sun S, Qi J, Lu G, Wen Z, Yang Y. Discrepancies in rhizobacterial assembly caused by glyphosate application and herbicide-tolerant soybean Co-expressing GAT and EPSPS. *J Hazard Mater*. 2023 May 15;450:131053. doi: 10.1016/j.jhazmat.2023.131053. Epub 2023 Feb 22. PMID: 36842198.
- [3] Yu H, Liu M, Gang D, Peng J, Hu C, Qu J. Polyethylene microplastics interfere with the nutrient cycle in water-plant-sediment systems. *Water Res*. 2022 May 1;214:118191. doi: 10.1016/j.watres.2022.118191. Epub 2022 Feb 14. PMID: 35219185.
- [4] Yang J, Liu G, Tian H, Liu X, Hao X, Zong Y, Zhang D, Shi X, Wang A, Li P, Lam SK. Trade-offs between wheat soil N₂O emissions and C sequestration under straw return, elevated CO₂ concentration, and elevated temperature. *Sci Total Environ*. 2023 Sep 20;892:164508. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.164508. Epub 2023 May 27.
- [5] Fazal A, Wen Z, Yang M, Wang C, Hao C, Lai X, Jie W, Yang L, He Z, Yang H, Cai J, Qi J, Lu G, Niu K, Sun S, Yang Y. Triple-transgenic soybean in conjunction with glyphosate drive patterns in the rhizosphere microbial community assembly. *Environ Pollut*. 2023 Oct 15;335:122337. doi: 10.1016/j.envpol.2023.122337. Epub 2023 Aug 8. PMID: 37562532.

相关系列产品:

- BC3010/BC3015 土壤羟胺还原酶 (S-HR) 活性检测试剂盒
- BC1970/BC1975 土壤木质素过氧化物酶 (S-Lip) 活性检测试剂盒
- BC4030/BC4035 土壤 β -1,4-葡聚糖酶/纤维二糖苷酶 (S-C1) 活性检测试剂盒
- BC4020/BC4025 土壤亮氨酸氨基肽酶 (S-LAP) 活性检测试剂盒
- BC0240/BC0245 土壤蔗糖酶 (S-SC) 活性检测试剂盒
- BC3100/BC3105 土壤硝酸还原酶 (S-NR) 活性检测试剂盒

流程图: (见下页)



BC2995-100T/48S 土壤亚硝酸还原酶

