

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

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：BC3010

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 15mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×2 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 50mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	液体 15mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂六	液体 10mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂七	液体 10mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

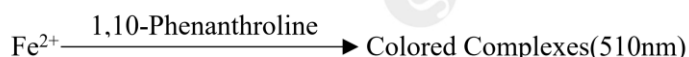
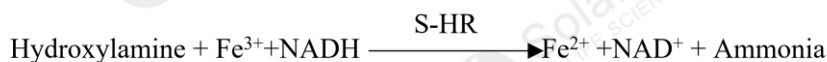
溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前取 1 瓶加入 7.5mL 蒸馏水充分溶解备用，用不完的试剂可以 2-8℃保存一周；
- 2、试剂三：临用前沸水浴中加热 15min，开盖 10s 后立即拧紧盖子，待自然冷却后再使用。使用过程中尽量不要敞口放置，取完立即加盖拧紧。若长期敞口放置，可再次沸水浴 10min（盖盖儿）冷却至常温使用；
- 3、试剂四：临用前加 30mL 蒸馏水溶解，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 2 周；
- 4、标准品：临用前加 1.028mL 蒸馏水充分溶解，制备 140μmol/mL 盐酸羟胺标准溶液待用，2-8℃保存 2 周。

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、水浴锅、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、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、分光光度计预热30min以上，调节波长至510nm，蒸馏水调零。

2、标准液的稀释：将140μmol/mL标准液用蒸馏水稀释至4.375、2.1875、1.094、0.547、0.2735、0.13675μmol/mL的标准液备用。具体稀释可参考下表：

序号	稀释前浓度 (μmol/mL)	标准液体积 (μL)	蒸馏水体积 (μL)	稀释后浓度 (μmol/mL)
1	140	50	1550	4.375
2	4.375	500	500	2.1875
3	2.1875	500	500	1.094
4	1.094	500	500	0.547
5	0.547	500	500	0.2735
6	0.2735	500	500	0.13675

备注：下述实验中每个标准管需 200μL 标准溶液（注意不要在此步骤直接检测标准溶液吸光度）。

3、样本测定（在1.5mLEP管中依次加入下列试剂）

试剂名称	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，置于30℃水浴锅反应1h					
试剂四 (μL)	400	400	400	400	400
充分震荡10min，8000rpm，25℃，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，置于25℃水浴锅，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ΔA测定=(A无基质管-A空白管)-(A测定管-A对照管)，ΔA标准=A标准管-A空白管。每个测定管需设一个对照管（标准曲线、无基质管和空白管只需做1-2次）。

三、土壤羟胺还原酶活性计算

1、标准曲线的绘制：

根据标准管的浓度 (x, μmol/mL) 和吸光度 ΔA 标准 (y, ΔA 标准)，建立标准曲线。根据标准曲线，将 ΔA 测定 (y, ΔA 测定) 带入公式计算样本浓度 (x, μmol/mL)。



本产品仅供科学研究使用。请勿用于临床、诊断、食品、化妆品检测等用途。

For research use only. Do not use for clinical, diagnostic, food, cosmetic testing and other purposes.

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 μ 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 1/24d。

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. 当 ΔA 大于 0.8 时，建议将样本上清液稀释后再进行测定。
3. 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℃ 反应 1h。

实验实例：

- 1、分别称取 2 管 0.1g 三叶草土，按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A \text{ 测定} = (A \text{ 无基质管} - A \text{ 空白管}) - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) = 0.603 - (0.499 - 0.139) = 0.243$ ，带入标准曲线 $y = 0.1693x + 0.0083$ ，计算 $x = 1.3863$ ，按土壤质量计算 S-HR 酶活得：

S-HR 活性 (U/g 土样) = $4.8 \times x \div W = 4.8 \times 1.3863 \div 0.1 = 66.542 \text{ U/g 土样}$ 。

- 2、分别称取 2 管 0.1g 林土，按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A \text{ 测定} = (A \text{ 无基质管} - A \text{ 空白管}) - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) = 0.603 - (0.543 - 0.199) = 0.259$ ，带入标准曲线 $y = 0.1693x + 0.0083$ ，计算 $x = 1.4808$ ，按土壤质量计算 S-HR 酶活得：

S-HR 活性 (U/g 土样) = $4.8 \times x \div W = 4.8 \times 1.4808 \div 0.1 = 71.078 \text{ U/g 土样}$ 。

相关系列产品：

- BC2990/BC2995 土壤亚硝酸还原酶 (S-NiR) 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

