土壤亚硝酸还原酶(S-NiR)检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1833

保存：-20℃避光保存 12 个月

规格：48T/96T

产品简介

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，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。本试剂盒提供了一种简单的比色法来检测土壤亚硝酸还原酶（S-NiR）。其原理是亚硝酸盐能够在酸性条件下，与对－氨基苯磺酸及α-萘胺定量生成红色偶氮化合物；生成的红色偶氮化合物在 540nm 有最大吸收峰。亚硝酸还原酶可将亚硝酸盐还原为 NO，使样本中参与重氮化反应生成紫红色化合物的 NO_2^-减少，即 540nm 处吸光值减少。通过测定 540nm 处的吸光值的变化可反应土壤中亚硝酸还原酶的活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
试剂一	2mL	4mL	-20℃，避光保存
试剂二	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	4℃保存
试剂三	2mL	4mL	4℃保存
试剂四	5mL	10mL	4℃，避光保存
试剂五	5mL	10mL	4℃，避光保存
标准品（1M $NaNO_2$）	1mL	1mL	-20℃，避光保存

自备耗材

酶标仪或可见光分光光度计（能测 540nm 处的吸光值）、烘箱、水浴锅
96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头
台式离心机、30-50 目筛
去离子水

试剂准备

试剂一：即用型；使用前平衡到室温；-20℃避光保存。
试剂二：临用前48T加2mL去离子水，96T加4mL去离子水溶解；4℃保存一个月或分装-20℃长期保存。
试剂三：即用型；使用前平衡到室温；4℃保存。如出现沉淀可以 70-80℃加热溶解
试剂四：即用型；使用前平衡到室温；实验过程中避光放置；避光 4℃保存。
试剂五：即用型；使用前平衡到室温；实验过程中避光放置；避光 4℃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。
标准品：含 1M $NaNO_2$，使用前平衡到室温；分装-20℃避光保存。
标准曲线设置：取 10μL $NaNO_2$ 标准品（1M）用 990μL 去离子水稀释至 10mM $NaNO_2$。取 10μL 10mM 的 $NaNO_2$ 用 990μL 去离子水稀释至 100μM $NaNO_2$。用 100μM $NaNO_2$按下表所示，进行下一步稀释：

	标准品体积（μL）	去离子水体积（μL）	浓度（μM）

Std.1	400μL 100μM $NaNO_2$	0	100
Std.2	200μL of Std.1	200	50
Std.3	200μL of Std.2	200	25
Std.4	200μL of Std.3	200	12.5
Std.5	200μL of Std.4	200	6.25
Std.6	200μL of Std.5	200	3.13
Std.7	200μL of Std.6	200	1.56

注意：标准品现配现用；稀释后的标准溶液不稳定，必须在 4 小时内使用。

样本制备

新鲜土样自然风干或 37 度烘箱风干，过 30-50 目筛。

实验步骤

1.酶标仪或可见光分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 540nm，可见光分光光度计去离子水调零。
2.样本测定（在 EP 管中操作）：

试剂名称	测定管	对照管	标准管	空白管
风干土样（g）	0.02	0.02	0	0
去离子水（μL）	0	40	0	0
试剂一（μL）	40	40	0	0
试剂二（μL）	40	0	0	0
混匀后，25℃反应 1h				
试剂三（μL）	40	40	0	0
充分震荡 30S，10000rpm，4℃，离心 10min，取上清液加入 96 孔板或微量玻璃比色皿中				
上清液（μL）	70	70	0	0
标准液（μL）	0	0	70	0
去离子水（μL）	0	0	0	70
工作液（μL）	140	140	140	140

充分混匀，37℃孵育 30min 后测定 540nm 处吸光值，计算 $\Delta A_{测}=A_{对照}-A_{测定}$，$\Delta A_{标}=A_{标准}-A_{空白}$。每个测定管需设一个对照，标准曲线和空白只需要测一次。

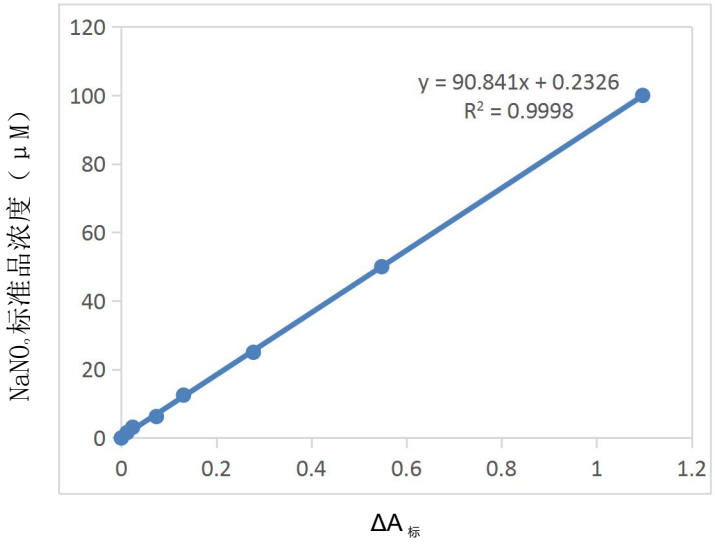
注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果 $\Delta A_{测}$小于 0.005 可适当加大样本量。如果 $\Delta A_{测}$大于 1.0，样本可用去离子水进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量。

结果计算

1. 标准曲线的绘制
以标准溶液浓度为 y 轴，$\Delta A_{标}$为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。将样本的 $\Delta A_{测}$代入方程得到 y 值（1μM=1μmol/L=1×10^{-3}μmol/mL）。
2. S-NiR 活性计算：
单位的定义：每天每 g 土样在反应体系中还原 1μmol NO_2^- 的量为一个酶活力单位 U。
S-NiR（U/g 土样）=$y\times10^{-3}\times V_{反总}\div W\div T=0.096y$
$V_{反总}$：反应体系总体积，0.08mL；T：反应时间，1h=1/24d；W：样本质量，0.02g。

结果展示

典型标准曲线-以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1825 土壤硝酸还原酶（S-NR）检测试剂盒（微量法）
PMK1819 土壤脲酶（S-UE)检测试剂盒（微量法）
PMK1826 土壤蔗糖酶(S-SC)检测试剂盒（微量法）
PMK1829 土壤碱性磷酸酶（S-AKP/ALP）检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：