

土壤羟胺还原酶（HR）试剂盒说明书

（货号：BP10095F 分光法 24 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

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琳形成橙红色配合物，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大小。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	粉体 1 瓶	4°C 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 5mL 蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉体 1 瓶	4°C 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 10mL 蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 25mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂四	液体 16mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂五	液体 8mL×1 瓶	4°C 避光保存	
试剂六	粉体 1 瓶	4°C 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 5mL 蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂七	粉体 1 瓶	4°C 避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 5mL 无水乙醇溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉剂 1 支	4°C 避光保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、氮吹仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

土取新鲜土样风干或者 37 度烘箱风干，先粗研磨，过 40 目筛网备用。

【注】：1. 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. 土壤风干，减少土壤中水分对于实验的干扰；土壤过筛，保证取样的均匀细腻；

2、检测步骤：

- ① 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 510nm，蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃）。
- ③ 试剂三尽量不要敞口放置，取完立即加盖拧紧。
- 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。
- ⑤ 在 1mLEP 管中依次加入：

试剂组分（μL）	空白管	测定管	对照管
风干土样（g）		0.1	0.1
试剂一	160	160	
蒸馏水			160
试剂二	160	160	160
试剂三	480	480	480
混匀后，用 N ₂ 气流排除管中空气，立即密封，于 30℃ 反应 1h			
试剂四	320	320	320
充分震荡 10min，8000rpm，室温（25℃）离心 10min，取上清液待测。			

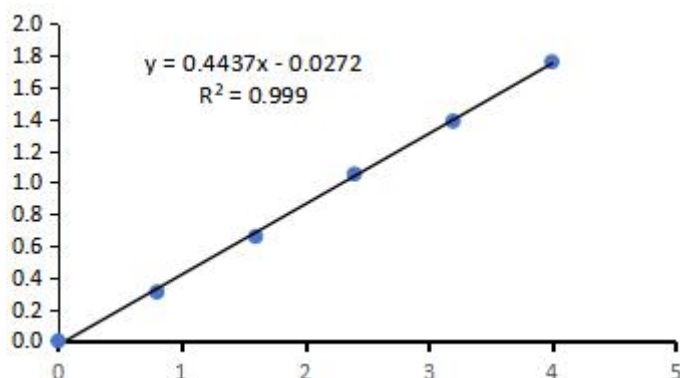
- ⑥ 显色反应，在 96 孔板中依次加入：

上清液	80	80	80
试剂五	160	160	160
试剂六	80	80	80
试剂七	80	80	80
蒸馏水	400	400	400
充分混匀，25℃ 静置显色 10min，于 510nm 处读取各管吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{空白}} - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}})$ 。			

【注】若 ΔA 在零附近徘徊，可加大土壤取样量（如增至 0.15g），或延长 30℃ 的反应时间至 4h 或更长，或在显色反应阶段加大上清液的量（如增加至 120μL，则蒸馏水相应减少）。则改变后的样本质量 W 或反应时间 T 或上清液体积 V2 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 0.4437x - 0.0272$ ，x 是标准品羟胺质量（μg），y 是 ΔA 。



- 2、酶活定义：每克土壤每小时转化 1μg 羟胺为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{HR 活性}(\mu\text{g/d/g 土样}) &= (\Delta A + 0.0272) \div 0.4437 \times (V1 \div V2) \div W \div T \\ &= 31.6 \times (\Delta A + 0.0029) \div W \end{aligned}$$

V1---加入提取液体积, 1.12mL; V2---显色反应阶段上清液体积, 0.08mL
W---样本质量, g; T---1h。

附：标准曲线制作过程：

- 1 向标准品 EP 管里面加入 2ml 蒸馏水（母液需在两天内用且-20℃保存），标准品母液浓度为 1mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 40uL，加入 960uL 蒸馏水，混匀得到 0.05mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据显色反应阶段测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	80	
蒸馏水		80
试剂五	160	160
试剂六	80	80
试剂七	80	80
蒸馏水	400	400
充分混匀，25℃静置显色 10min，于 510nm 处读取各管吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		