

土壤羟胺还原酶（HR）检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1337

产品规格：100管/48样

产品简介：

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。

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体5mL×1瓶	4℃
试剂二	粉剂×1瓶	4℃
试剂三	液体15mL×1瓶	4℃
试剂四	液体10mL×1瓶	4℃
试剂五	液体5mL×1瓶	4℃
试剂六	液体2.5mL×1瓶	4℃
试剂七	液体2.5mL×1瓶	4℃
标准品	粉剂×1瓶	4℃

溶液的配制：

1. 试剂二：临用前加入5mL蒸馏水充分溶解备用；
2. 标准品：临用前加入1.028mL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。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、天平、台式离心机、微量玻璃比色皿/96孔板、可调式移液枪、30-50目筛、漩涡振荡仪、氮吹仪、研钵、EP管、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）	0.02	0.02	-	-	-



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

试剂一 (μL)	-	40	40	-	-
标准溶液 (μL)	-	-	-	40	-
蒸馏水 (μL)	40	-	-	-	40
试剂二 (μL)	40	40	40	40	40
试剂三 (μL)	120	120	120	120	120
混匀后, 用氮气 (N ₂) 流排除管中空气, 立即密封, 于30℃反应1h					
试剂四 (μL)	80	80	80	80	80
充分震荡10min, 8000rpm, 25℃, 离心10min					
上清液 (μL)	20	20	20	20	20
试剂五 (μL)	40	40	40	40	40
试剂六 (μL)	20	20	20	20	20
试剂七 (μL)	20	20	20	20	20
蒸馏水 (μL)	100	100	100	100	100
充分混匀, 25℃静置显色10min, 于微量玻璃比色皿/96孔板中测定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 带入方程得到 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) = $x \times V \text{ 试剂一} \div W \div T = 0.96x \div W$

V 试剂一: 加入试剂一体积, 0.04mL; W: 样本质量, g; T: 反应时间 1/24h。

注意事项:

- 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。
- 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。
- 当 ΔA 大于 0.5 时, 建议将样本上清液稀释后再进行测定。
- 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:

- 取 2 管 0.02g 三叶草土, 按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A = (A \text{无基质管} - A \text{空白管}) - (A \text{测定管} - A \text{对照管}) = 0.38 - (0.326 - 0.116) = 0.170$, 标准曲线: $y = 0.0923x + 0.0138$, $x = 1.6923$, 按土壤重量计算 S-HR 酶活得: S-HR 活性 (U/g 土样) = $x \times 0.04 \div W \div T = 1.6923 \times 0.04 \div 0.02 \times 24 = 81.23$ U/g 土样。
- 取 2 管 0.02g 林土, 按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A = (A \text{无基质管} - A \text{空白管}) - (A \text{测定管} - A \text{对照管}) = 0.38 - (0.316 - 0.086) = 0.150$, 标准曲线: $y = 0.0923x + 0.0138$, $x = 1.4756$, 按土壤重量计算 S-HR 酶活得: S-HR 活性 (U/g 土样) = $x \times 0.04 \div W \div T = 1.4756 \times 0.04 \div 0.02 \times 24 = 70.829$ U/g 土样。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com