

土壤羟胺还原酶（hydroxylamine reductase,HR）试剂盒说明书

（微板法 48 样）

一、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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉体 mg×1 瓶	4℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部，再加 3mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	粉体 mg×1 瓶	4℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部，再加 5mL 蒸馏水溶解备用。
试剂三	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 8mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	液体 4mL×1 瓶	4℃保存	
试剂六	粉体 mg×1 瓶	4℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部，再加 3mL 蒸馏水溶解备用。
试剂七	粉体 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部，再加 3mL 无水乙醇溶解备用。
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、天平、常温离心机、震荡仪、氮吹仪。

四、土壤羟胺还原酶（HR）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

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.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.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、上机检测：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 510nm。
- 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：

试剂名称（ μL ）	空白管	测定管	对照管
风干土样（g）		0.02	0.02
试剂一	40	40	
蒸馏水			40

试剂二	40	40	40
试剂三	120	120	120
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	80	80	80
充分震荡 10min，8000rpm，室温（25℃）离心 10min，取上清液待测。			

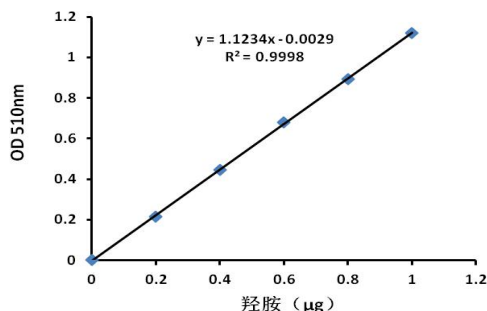
⑥ 显色反应，在 96 孔板中依次加入：

上清液	20	20	20
试剂五	40	40	40
试剂六	20	20	20
试剂七	20	20	20
蒸馏水	100	100	100
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 0.05g），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 50 μ L，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： $y = 1.1234x - 0.0029$ ，x 是标准品羟胺质量（ μ g），y 是 ΔA 。



2、酶活定义：每克土壤每小时转化 1 μ g 羟胺为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{HR 活性}(\mu\text{g/d/g 土样}) &= (\Delta A + 0.0029) \div 1.1234 \times (V_1 \div V_2) \div W \div T \\ &= 12.5 \times (\Delta A + 0.0029) \div W \end{aligned}$$

V₁---加入提取液体积，0.28mL； V₂---显色反应阶段上清液体积，0.02mL

W---样本质量，g； T---1h。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（1mg/mL）：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）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据显色反应阶段加样体系操作，20 μ L 上清液换成标准品，以标准品的质量为横坐标，吸光值为纵坐标，即可制作标准曲线。