



土壤羟胺还原酶活性检测试剂盒

HR Assay Kit

微量法

产品编号：AK454M

产品规格：100T/48S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
AK454-A	4mL×1 瓶	4℃保存；
AK454-B	粉剂×1 瓶	4℃保存；临用前加4mL蒸馏水溶解。
AK454-C	12mL×1 瓶	4℃保存；
AK454-D	8mL×1 瓶	4℃保存；
AK454-E	4mL×1 瓶	4℃保存；
AK454-F	2mL×1 瓶	4℃避光保存；
AK454-G	2mL×1 瓶	4℃避光保存；
AK454-标准品	粉剂×1 支	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，4℃保存保存 2 周

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介：

意义：土壤羟胺还原酶（hydroxylamine reductase, HR）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。

原理：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。

自备用品：

可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、天平、常温离心机、震荡仪、氮吹仪。

样本处理

新鲜土样自然风干或 37 度烘箱风干，过 30~50 目筛。

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。
3. 样本测定，（在 EP 管中依次加入下列试剂）：

	无基质管	对照管	测定管	标准管	空白管
风干土样 (g)		0.02	0.02		
AK454-A (μL)	40		40		
蒸馏水 (μL)		40			40
标准溶液				40	
AK454-B (μL)	40	40	40	40	40
AK454-C (μL)	120	120	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					
AK454-D (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

AK454-E (μL)	40	40	40	40	40
AK454-F (μL)	20	20	20	20	20
AK454-G (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，用蒸馏水调零，于微量石英比色皿/96 孔板测定 510nm 各管吸光值，分别记为 A 空白管、A 标准管、A 对照管、A 测定管， $\Delta A = A \text{ 空白管} - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管})$ 。

计算公式：

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线： $y = 0.185x - 0.1828$ ， $R^2 = 0.9992$

酶活定义：每克土壤每天转化 1μg 羟胺为一个酶活力单位。

HR 活性 (μg/d /g 土样) = $(\Delta A + 0.1828) \div 0.185 \times V \text{ 反总} \div W \div T = 36.32 \times (\Delta A + 0.1828) \div W$

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线： $y = 0.0925x - 0.1828$ ， $R^2 = 0.9992$

酶活定义：每克土壤每天转化 1μg 羟胺为一个酶活力单位。

HR 活性 (μg/d /g 土样) = $(\Delta A + 0.1828) \div 0.0925 \times V \text{ 反总} \div W \div T = 72.64 \times (\Delta A + 0.1828) \div W$

注：V 反总：加入提取液体积，0.28mL；W：样本质量，g；T：1/24h。

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. AK454-C 尽量不要敞口放置，取完立即加盖拧紧。
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。