

土壤硝酸还原酶 (Soil-Nitrate Reductase, S-NR) 试剂盒说明书

(货号: G0309F 分光法 24 样)

一、产品简介:

土壤硝酸还原酶可以把土壤中的硝酸盐转变为亚硝酸盐,然后再通过亚硝酸还原酶的作用转变成氮循环的重要原料-铵,从而调节氮代谢,并影响到光合碳代谢,进而影响植物生长。

本试剂盒提供一种快速、精确的测定方法,土壤硝酸还原酶催化硝酸盐还原为亚硝酸盐;同时抑制亚硝酸还原酶对产生的亚硝酸盐的降解,亚硝酸盐与对应的显色剂反应生成(粉)红色偶氮化合物;该物质在 540nm 有最大吸收峰,进而得出土壤硝酸还原酶的活性。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 3mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	液体 14mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	A 液 12mL×1 瓶	4°C保存	临用前,可依据待检测样本数量,把 A 液和 B 液等比例混合成无色的反应 mix (注意观察,若变粉色,则不能使用)。两天之内用完。
	B 液 12mL×1 瓶		
标准品	粉体 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲,则用到该试剂

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、水浴锅、台式离心机、可调式移液器。

四、土壤硝酸还原酶(S-NR)的测定:

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

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】: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、测定步骤

① 可见分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 540nm,蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
风干土样 (g)	0.25	0.25
试剂一	200	200
试剂二	50	50
蒸馏水	250	250
	混匀,且务必用封口膜封口。25°C培养 24h	混匀,且务必用封口膜封口。-20°C培养 24h (可放在-20°C冰箱)
试剂三	500	500
混匀, 12000rpm, 4°C离心 10min, 上清液待用		

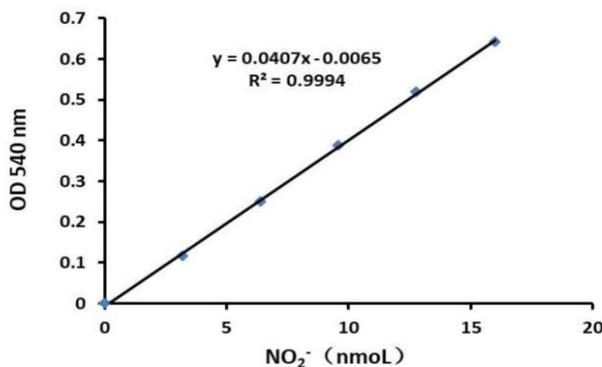
③ 显色反应，在 EP 管中依次加入：

上清液	160	160
试剂四	240	240
反应 mix	400	400
混匀，25℃反应 5min（准确时间），全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，立即于 540nm 处读取 A 值， $\Delta A = A - A_{\text{测定-A 对照}}$ （每个样本做一个自身对照管）。		

【注】：若 ΔA 低于 0.01，可增加第③步中上清液体积 V_2 （如由 160 μL 增至 300 μL ，则试剂四减至 100 μL ，保持总体积仍为 800 μL ），则改变后的 V_2 带入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0407x - 0.0065$ ； x 为标准品摩尔质量（nmol）， y 为吸光值 ΔA 。



2、单位定义：每天每克土样中产生 1 μmol 的 NO_2^- 的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{S-NR}(\mu\text{mol/d/g 干土}) &= [(\Delta A + 0.0065) \div 0.0407 \times 10^{-3} \div V_2 \times V_1] \div W \div T \\ &= 0.153 \times (\Delta A + 0.0065) \div W \end{aligned}$$

3、单位定义：每天每克土样中产生 1 μg NO_2^- 的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{S-NR}(\mu\text{g/d/g 干土}) &= [(\Delta A + 0.0065) \div 0.0407 \times 10^{-3} \div V_2 \times V_1] \div W \div T \times 46 \\ &= 7.06 \times (\Delta A + 0.0065) \div W \end{aligned}$$

V_1 ----反应体系总体积，1mL；

V_2 ---③步中上清液体积，160 μL =0.16mL；

T ---反应时间，24h=1d；

W ---样本实际质量，g；

标准品的分子量---69；

NO_2^- 的分子量---46。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（100 $\mu\text{mol/mL}$ ）：把标准品完全溶解于 1mL 蒸馏水中（母液需在两天内用且-20℃保存）。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度标准品：0, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.2. $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据显色反应阶段的测定管的加样顺序操作，根据结果即可制作标准曲线。