

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

(货号: G0309W 微板法 48 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;该有色物质在 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 25mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 6mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	液体 7mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	A 液 6mL×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 6mL×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:

酶标仪、96 孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、蒸馏水。

### 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 酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 540nm。

② 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
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		

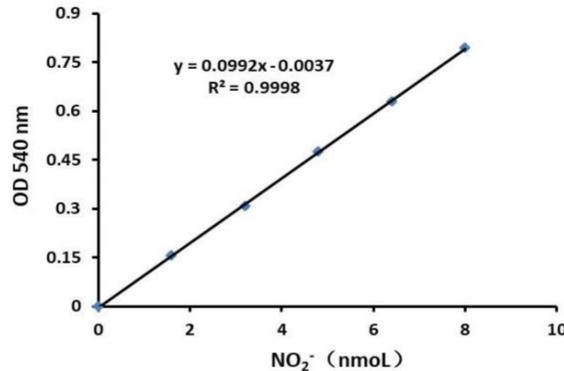
③ 显色反应，在 96 孔板中依次加入：

上清液(μL)	40	40
试剂四	60	60
反应 mix	100	100
混匀，25°C反应 5min（准确时间），立即于 540nm 处读取 A 值， ΔA=A 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步中上清液的体积 V2（如由 40μL 增至 100μL，则试剂四减至 0μL，保持总体积仍为 200μL），则改变后的 V2 带入公式重新计算。

## 五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0992x - 0.0037$ ；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 1μmol 的 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 的量为一个酶活力单位。

$$S-NR(\mu\text{mol/d/g 土样}) = [(\Delta A + 0.0037) \div 0.0992 \times 10^{-3} \div V2 \times V1] \div W \div T$$

$$= 0.252 \times (\Delta A + 0.0037) \div W$$

3、单位定义：每天每克土样中产生 1μg 的 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 的量为一个酶活力单位。

$$S-NR(\mu\text{g/d/g 土样}) = [(\Delta A + 0.0037) \div 0.0992 \times 10^{-3} \div V2 \times V1] \div W \div T \times 46$$

$$= 11.6 \times (\Delta A + 0.0037) \div W$$

V1---反应体系总体积，1mL；

V2---③步中上清液体积，40μL=0.04mL；

T---反应时间，24h=1d；

W---样本实际质量，g；

标准品分子量---69；

NO<sub>2</sub><sup>-</sup>的分子量---46。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（100μmol/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°C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. μmol/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。