

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

(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 1mLEP 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		

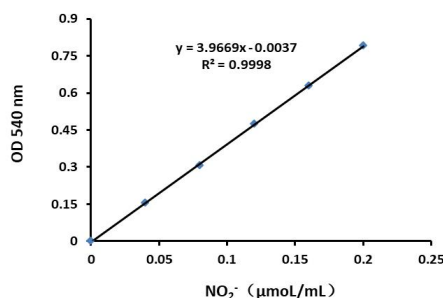
③ 显色反应，在 96 孔板中依次加入：

上清液	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， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照管）。		

【注】：若 ΔA 值低于 0.01，可增加③步中上清液的体积（如由 40 μL 增至 100 μL ，则试剂四减至 0 μL ，保持总体积仍为 200 μL ）。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 3.9669x - 0.0037$ ； x 为标准品浓度（ $\mu\text{mol/mL}$ ）， 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。

$$\begin{aligned} \text{S-NR}(\mu\text{mol/d/g 土样}) &= [(\Delta A + 0.0037) \div 3.9669 \times V_1] \div W \div T \\ &= 0.252 \times (\Delta A + 0.0037) \div W \end{aligned}$$

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

$$\begin{aligned} \text{S-NR}(\mu\text{g/d/g 土样}) &= [(\Delta A + 0.0037) \div 3.9669 \times V_1] \div W \div T \times 46 \\ &= 11.6 \times (\Delta A + 0.0037) \div W \end{aligned}$$

V_1 ---反应体系总体积，1mL； 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°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. $\mu\text{mol/mL}$ 。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。