

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

(货号: BP10129W 微板法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 25mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	液体 6mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂三	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 7mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	A 液 6mL×1 瓶	4℃避光保存	1. 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); 2. 两天之内用完。
	B 液 6mL×1 瓶		
标准品	粉体 1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取

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:

试剂组分 (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℃培养 24h	混匀，且务必用封口膜封口。20℃培养 24h（可放在-20℃冰箱）
试剂三	500	500
混匀，12000rpm，4℃离心 10min，上清液待用		

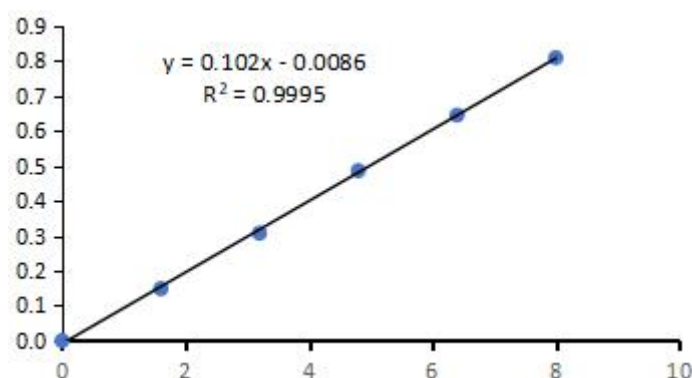
③ 显色反应，在 96 孔板中依次加入：

上清液(μL)	40	40
试剂四	60	60
反应 mix	100	100
混匀，25℃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 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： $y = 0.102x - 0.0086$ ；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_2^- 的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} S\text{-NR}(\mu\text{mol/d/g 土样}) &= [(\Delta A + 0.0086) \div 0.102 \times 10^{-3} \div V2 \times V1] \div W \div T \\ &= 0.245 \times (\Delta A + 0.0086) \div W \end{aligned}$$

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

$$\begin{aligned} S\text{-NR}(\mu\text{g/d/g 土样}) &= [(\Delta A + 0.0086) \div 0.102 \times 10^{-3} \div V2 \times V1] \div W \div T \times 46 \\ &= 11.27 \times (\Delta A + 0.0086) \div W \end{aligned}$$

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_2^- 的分子量---46。

附：标准曲线制作过程：

- 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），标准品母液浓度为 100μmol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.2 μmol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 标品稀释参照表如下：

1. 吸取标准品母液 20uL，加入 980uL 蒸馏水，混匀得到 2μmol/mL 的标品稀释液待用；
--

2. 吸取 2 μ mol/mL 的标品稀释液 100 μ L，加入 900 μ L 蒸馏水，混匀得到 0.2 μ mol/mL 的标品稀释液待用

标品浓度 μ mol/mL	0	0.04	0.08	0.12	0.16	0.2
标品稀释液 μ L	0	40	80	120	160	200
水 μ L	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据显色反应阶段测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	40	
蒸馏水		40
试剂四	60	60
反应 mix	100	100
混匀，25 $^{\circ}$ C 反应 5min (准确时间)，立即于 540nm 处读取 A 值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$ 。		