

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

微量法 100 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义

S-NR 催化土壤中硝酸盐还原为亚硝酸盐，是土壤硝态氮还原的关键酶。研究 S-NR 的活性对合理施肥，降低氮素的损失具有重要意义。

测定原理

S-NR 催化硝酸盐还原为亚硝酸盐， $\text{NO}_3^- + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$ ；产生的亚硝酸盐能够在酸性条件下，与对-氨基苯磺酸及 α -萘胺定量生成红色偶氮化合物；生成的红色偶氮化合物在 540 nm 有最大吸收峰，可用分光光度法测定。

需自备的仪器和用品

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板和蒸馏水。

试剂的组成和配制

试剂一：液体 12mL×1 瓶，-20℃ 保存。

试剂二：液体 8mL×1 瓶，-20℃ 保存。

试剂三：液体 9mL×1 瓶，4℃ 保存（如出现结晶析出，60℃-90℃ 水浴溶解后使用）。

试剂四：液体 9mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂五：标准品储备液 1mL，-20℃ 保存。

0.1μmol/mL 标准液的配制：用时将试剂五稀释 100 倍，即取 0.1ml 加蒸馏水定容至 10ml。

样品处理：

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、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm，蒸馏水调零。

2、样本测定

试剂名称	1mL 带盖离心管			
	测定管	对照管	标准管	空白管
风干土样 (g)	0.06	0.06		
0.1μmol/mL 标准液(μL)			60	
蒸馏水 (μL)		225		285
试剂一 (μL)	225		225	
试剂二 (μL)	75	75	75	75

混匀后，盖盖后 37℃ 水浴 24h，8000g 25℃ 离心 10min，取上清液

上清液 (μL)	130	130	130	130
试剂三 (μL)	85	85	85	85
试剂四 (μL)	85	85	85	85

混匀，25℃ 显色 20min，4000g，25℃ 离心 10min，取 200uL 上清液至微量石英比色皿或 96 孔板中，540nm 下读取各管吸光值。标准管和空白管只需测一次。每个测定管设一个对照管。

注意点：

务必先做 2 个样本的预测定，少部分土壤由于样本特殊性可能出现测定管小于对照管，请及时与我司技术支持联系，以获得针对样本特殊性的调整测定方法。

S-NR 活性计算：

单位的定义：每天每 g 土样中产生 $1\mu\text{mol NO}_2^-$ 的量为一个 S-NR 活力单位。

$$\text{S-NR } (\mu\text{mol /d/g 土样}) = \frac{C \text{ 标准} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管})}{(A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V \text{ 反总} \div W \div T} = 0.5 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})$$

C 标准管：标准管浓度， $0.1\mu\text{mol/mL}$ ；V 反总：反应体系总体积， 0.3mL ；T：反应时间， 24h ；W：样本质量， 0.06g 。