

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0831

Size: 50T/24S

土壤硝酸还原酶（S-NR）检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、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；未反应的 NADH 会抑制后续的显色反应，用 PMS 将其中和后再进行后续反应；生成的红色偶氮化合物在 520nm 有最大吸收峰，可用分光光度法测定。

三、需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量比色皿/96 孔板、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 30mL × 1 瓶	-20℃保存	
试剂二	粉剂 5mL × 1 瓶	-20℃保存	临用前加入 5ml 蒸馏水
试剂三	粉剂 5mL × 1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉剂 10mL × 1 瓶	-20℃保存	临用前加入 10ml 蒸馏水
试剂五	液体 25mL × 1 瓶	4℃保存	如出现结晶析出，60 度水浴溶解后使用
试剂六	液体 25mL × 1 瓶	4℃保存	
标准品	液体 1mL × 1 支	-20℃保存	10 μmol/mL 亚硝酸钠
标准液的配制：用时蒸馏水将标准品稀释 0.8、0.6、0.4、0.2、0.1 μmol/mL。			

五、操作步骤：

1. 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 520nm，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)	0.1	0.1		
NaNO ₂ 标准液 (μL)			100	
蒸馏水 (μL)				100
试剂一 (μL)	365	365	365	365
试剂二 (μL)	35		35	35
混匀后，于 37℃水浴 60min。				

试剂三 (μL)	50	50	50	50
试剂二 (μL)		35		
立刻混匀, 8000rpm 室温离心 5min				
上清液 (μL)	400	400	400	400
试剂四 (μL)	100	100	100	100
混匀后, 于 37°C 保温 20min。				
试剂五 (μL)	250	250	250	250
试剂六 (μL)	250	250	250	250

混匀, 显色 20min 后, 520nm 下读取各管吸光值。计算 ΔA 测定 = A 测定 - A 对照。 ΔA 标准 = A 标准 - A 空白。

六、活性计算:

1、标准曲线绘制:

以 0.8、0.6、0.4、0.2、0.1 μmol/mL 标准溶液为横坐标, ΔA 标准为纵坐标绘制标准曲线, 得到线性回归方程 $y=kx+b$, 将 ΔA 测定代入方程得到 x (μmol/mL);

2、S-NR 活性计算

单位的定义: 24h 每 g 土样中产生 1 μmol NO_2^- 的量为一个 S-NR 活力单位。

$$\text{S-NR (U/g)} = x \times V \text{ 标准} \div W \div T = 24 \times x$$

V 标准: 反应体系中加入的标准液体积, 0.1mL; W: 样本鲜重, 0.1g; T: 反应时间, 1/24h。

七、注意事项:

- 1、试剂一、试剂二和试剂四在冰上放置, 用完立即放回 -20°C。
- 2、每个测定管设一个对照管。
- 3、 ΔA 测定过小 (小于 0.01), 可延长反应时间 (37°C 水浴时间)