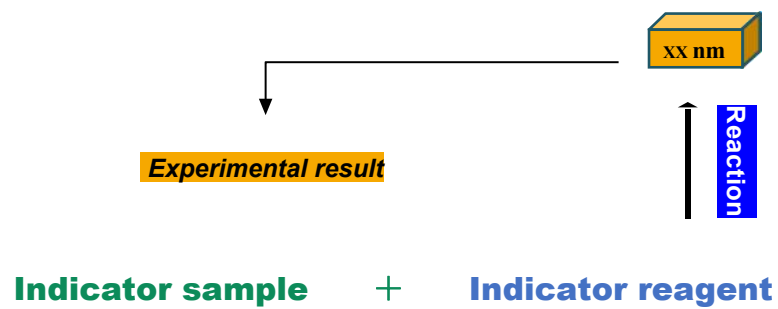


上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

货号：ZC-S0831

规格：50管/24样

## 土壤硝酸还原酶（S-NR）检测试剂盒说明书

可见分光光度法

**注意：**正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

**产品内容：**

| 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。 |            |        |                     |

**产品说明：**

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。

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 520 nm 有最大吸收峰，可用分光光度法测定。

**自备实验用品及仪器：**

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。

**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 <sub>2</sub> 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℃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  $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。  $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。

## 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,  $\Delta A$  标准为纵坐标绘制标准曲线, 得到线性回归方程  $y=kx+b$ , 将  $\Delta A$  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<sub>2</sub><sup>-</sup> 的量为一个 S-NR 活力单位。

$$\begin{aligned} \text{S-NR (U/g)} &= x \times V_{\text{标准}} \div W \div T \\ &= 24 \times x \end{aligned}$$

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。

## 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℃。
- 2、每个测定管设一个对照管。
- 3、 $\Delta A$  测定过小 (小于 0.01), 可延长反应时间 (37℃水浴时间)