

## Soil-Nitrite reductase (S-NR) Activity Assay Kit

### 土壤亚硝酸还原酶（S-NiR）试剂盒说明书

货号：BN72570 | 方法：可见分光法 | 规格：24 样

#### 一、产品简介：

土壤亚硝酸还原酶是反硝化作用的关键酶，它是由土壤反硝化细菌产生的一种还原类酶，参与亚硝酸盐至 NO 的还原反应，它的活性反映了生物降解过程中氮素的转化效率，为氮素转化规律的研究提供一定的依据。

土壤亚硝酸还原酶可将 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>还原为 NO，使样品中参与重氮化反应生成（粉）红色化合物的 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>减少，该（粉）红色物质在 540nm 有最大吸收峰，通过检测 540nm 处吸光值的变化来反应土壤亚硝酸还原酶的活性。

#### 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 15mL×1 瓶  | 4℃保存 |                                                                   |
| 试剂二  | 液体 30mL×1 瓶  | 4℃保存 | 有沉淀，临用前混匀即可                                                       |
| 试剂三  | 液体 12mL×1 瓶  | 4℃保存 | 试剂会出现过饱和，临用前 25℃水浴，5min 即可使用。                                     |
| 试剂四  | A 液 21mL×1 瓶 | 4℃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 21mL×1 瓶 |      |                                                                   |
| 标准品  | 粉体 mg×1 支    | 4℃保存 | 若重新做标曲，则用到该试剂                                                     |

#### 三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、天平、水浴锅、低温离心机、可调式移液器。

#### 四、土壤亚硝酸还原酶（S-NiR）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 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 540nm，蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入：

| 试剂名称（μL） | 测定管 | 无基质对照管 | 无土对照管<br>（仅做一次） |
|----------|-----|--------|-----------------|
| 土样（g）    | 0.1 | 0.1    |                 |
| 试剂一      | 400 |        | 400             |
| 蒸馏水      | 800 | 1200   | 800             |
| 试剂二      | 500 | 500    | 500             |

|                              |     |     |     |
|------------------------------|-----|-----|-----|
| 混匀，且务必用封口膜封口，25℃，培养 24h      |     |     |     |
| 试剂三                          | 200 | 200 | 200 |
| 混匀，12000rpm，4℃离心 10min，上清液待用 |     |     |     |

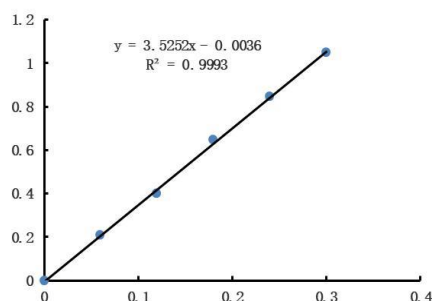
③ 显色反应，②步得到的上清液用蒸馏水稀释 70 倍后，在 EP 管中依次加：

|                                                                                                                                                           |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 上清液                                                                                                                                                       | 70  | 70  | 70  |
| 反应 mix                                                                                                                                                    | 700 | 700 | 700 |
| 混匀，25℃反应 5min（准确时间），取出全部澄清液体至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，立即于 540nm 处读取 A 值， $\Delta A = A_{\text{无土对照管}} - (A_{\text{测定管}} - A_{\text{无基质对照管}})$ ，（每个样本需做一个自身对照）。 |     |     |     |

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

## 五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 3.5252x - 0.0036$ ；x 为标准品浓度（ $\mu\text{mol/mL}$ ），y 为吸光值  $\Delta A$ 。



标准曲线示意图

说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

2、单位定义：每克土样每天还原  $1\mu\text{mol}$  的  $\text{NO}_2^-$  量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{S-NiR}(\mu\text{mol/d/g 土壤}) &= [(\Delta A + 0.0036) \div 3.5252 \times V1] \div W \div T \times D \\ &= 0.54 \times (\Delta A + 0.0036) \div W \times 70 \end{aligned}$$

3、单位定义：每克土样每天还原  $1\mu\text{g}$  的  $\text{NO}_2^-$  量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{S-NiR}(\mu\text{g/d/g 土壤}) &= [(\Delta A + 0.0036) \div 3.5252 \times V1] \div W \div T \times 46 \times D \\ &= 24.8 \times (\Delta A + 0.0036) \div W \times 70 \end{aligned}$$

V1---反应体系总体积， $1900\mu\text{L} = 1.9\text{mL}$ ；

T---反应时间， $24\text{h} = 1\text{d}$ ；

W---土样实际质量，g；

D---稀释倍数，70 倍；

标准品的分子量---69；

$\text{NO}_2^-$  的分子量---46。