

亚硝酸还原酶 (Nitrite reductase, NiR) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-N014-96 微板法 96 样)

一、产品简介:

亚硝酸还原酶 (NiR, EC1.7.2.1) 是一类能催化亚硝酸盐还原的氧化还原酶, 广泛存在于微生物及植物体内, 是自然界氮循环过程中的关键酶, 可以将亚硝酸盐降解为 NO 或 NH₃, 从而减少环境中亚硝态氮的积累, 降低因亚硝酸盐累积而造成的对生物体的毒害作用。

亚硝酸还原酶可将 NO₂⁻ 还原为 NO, 使样品中参与对-氨基苯磺酸及 α-萘胺定量生成 (粉) 红色偶氮化合物的 NO₂⁻ 减少, 根据颜色深浅即 540nm 处吸光值的变化可反应亚硝酸还原酶的活性。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 120mL×1 瓶	4°C保存	用前摇匀, 且用蒸馏水稀释一倍后做为提取液使用。
试剂一	粉体 4 支	4°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 每支加 3mL 提取液溶解。
试剂二	粉剂 1 瓶	4°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加 6mL 提取液溶解。
试剂三	试剂三 A mg×3 支 试剂三 B mg×3 支	4°C保存	临用前一支试剂 A 和 B 分别用 1mL 蒸馏水完全溶解, 再把 1mL 试剂 B 倒入 1mL 试剂 A 中混成试剂三 mix (一周内用完)。
试剂四	粉体 1 瓶	4°C保存	临用前加 12mL 蒸馏水溶解。
试剂五	液体 12mL×1 瓶	4°C保存	临用前, 可依据待检测样本数量, 把试剂五和六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。
试剂六	液体 12mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉体 1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、天平、研钵、水浴锅、低温离心机。

四、亚硝酸还原酶 (NiR) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本: 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。10000g 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液; 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 300W, 超声 3s, 间隔 7s, 总时间 3min); 10000g 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 按照细菌/细胞数量(10⁴个): 提取液体积(mL)为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 540nm。

② 在 EP 管中加入下列试剂:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂一	50	50
试剂二	50	
提取液	330	430
样本	20	20
试剂三 mix	50	
混匀，于 37°C 下反应 30min 后， 务必 于漩涡震荡仪上剧烈震荡 5min。		
试剂四	50	50
混匀，12000rpm，室温离心 5min，上清液待测。		

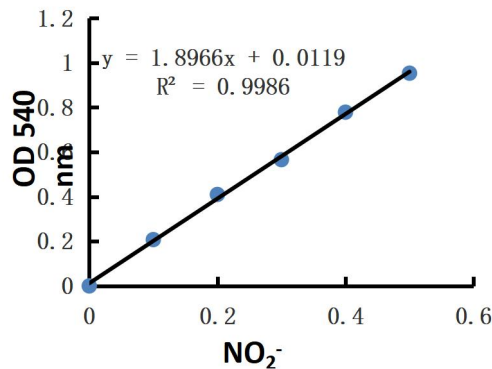
③ 显色反应，在 96 孔板中依次加入：

上清液	20	20
蒸馏水	100	100
反应 mix	100	100
混匀，室温反应 10min，立即于 540nm 处分别读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 对照 - A 测定（每个测定管需设一个对照管）。		

- 【注】**：1. 若 ΔA 值在零附近徘徊，可增加样本体积 V1（如增至 50μL 或更多，则提取液相应减少），或延长反应时间 T（如增至 1h），则改变后的 V1 或 T 代入计算公式重新计算。
2. ΔA 值需小于 1，若大于则需减少样本体积 V1（如减至 10μL 或更少，则提取液相应增加），或缩短反应时间 T（如减至 10min），则改变后的 V1 或 T 代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 1.8966x + 0.0119$ ；x 为标准品摩尔浓度（μmol/mL），y 为 ΔA 。



2、按照蛋白含量计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每小时还原 1μmol NO₂⁻ 的量为一个酶活力单位。

$$\text{NiR}(\mu\text{mol/h/mg prot}) = [(\Delta A - 0.0119) \div 1.8966 \times V2] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 29 \times (\Delta A - 0.0119) \div \text{Cpr}$$

3、按照样本质量计算：

酶活定义：每克组织每小时还原 1μmol NO₂⁻ 的量为一个酶活力单位。

$$\text{NiR}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0119) \div 1.8966 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T = 29 \times (\Delta A - 0.0119) \div W$$

4、按照细菌/细胞数量计算：

酶活定义：每 10⁴ 个细胞每小时还原 1μmol NO₂⁻ 的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NiR}(\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.0119) \div 1.8966 \times V2] \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \div T \\ &= 29 \times (\Delta A - 0.0119) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1mL；

V1---体系中加入样本体积，0.02mL；

V2--反应阶段总体积，0.55mL；

T---反应时间，30min=1/2h； 细胞数量---500 万；

W---样本质量, g; Cpr---样本蛋白含量, 建议使用本公司 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 标准品母液 (100 μ mol/mL): 标准品用 1mL 蒸馏水溶解。(需两天内用且-20 $^{\circ}$ C保存)。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. μ mol/mL。
- 3 按照显色反应阶段的加样顺序操作: 根据结果即可制作标准曲线。

