

亚硝酸还原酶 (NiR) 活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：AC10332

规格：100T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 3mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	粉剂×2 瓶	2-8°C保存
试剂三	粉剂×1 瓶	2-8°C保存
试剂四	液体 10mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂五	液体 10mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	液体 1mL×1 支	2-8°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：每瓶临用前加入 2.5mL 蒸馏水充分溶解，2-8°C保存 2 周；
- 2、试剂三：临用前加入 5mL 蒸馏水，可 70-80°C加热溶解；2-8°C可以保存 3 个月
- 3、试剂五：若出现沉淀，可 70-80°C加热溶解；
- 4、标准品：10 μ mol/mL 亚硝酸钠标准溶液；
- 5、工作液：临用前根据样本量将试剂四和试剂五按 1:1 的比例混合，现用现配。

产品说明：

亚硝酸还原酶 (Nitrite reductase, NiR) 是亚硝态氮还原过程中的关键酶，在自然界氮素循环过程中发挥着重要作用，其广泛存在于微生物及植物体内，能够催化亚硝酸盐还原，减少亚硝态氮在环境中的积累，降低其对生物体生长发育的毒害作用。

亚硝酸还原酶可将NO₂⁻还原为NO，使样本中参与重氮化反应生成紫红色化合物的NO₂⁻减少，即540nm处吸光值的变化可反应样本中亚硝酸还原酶的活性。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、天平、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 组织 按样本质量 (g)：提取液体积 (mL) 1：5~10 比例（建议称取 0.1g 样本，加入 1.0mL 提取液）加入提取液，冰浴匀浆后，于 4°C，10000g，离心 10min，弃沉淀，取上清液置于冰上待测。

2. 细菌或细胞: 按细胞数量 (10^4): 提取液体积 (mL) 500~1000:1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1.0mL 提取液) 加入提取液, 冰浴超声破碎细胞 (功率 200w, 超声 3s, 间隔 7s, 总时间 3min), 然后于 4°C, 10000g, 离心 10min, 弃沉淀, 取上清液置于冰上待测。

二、测定步骤

- 1、分光光度计/酶标仪预热30min 以上, 调节波长至540nm, 分光光度计蒸馏水调零。
- 2、标准液的稀释: 将10 μ mol/mL的标准溶液用蒸馏水等比稀释至0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625、0.003125 μ mol/mL标准溶液待测。
- 3、标准液稀释可参考下表:

序号	稀释前浓度 (μ mol/mL)	标准液体积 (μ L)	蒸馏水体积 (μ L)	稀释后浓度 (μ mol/mL)
1	10	20	180	1
2	1	100	400	0.2
3	0.2	200	200	0.1
4	0.1	200	200	0.05
5	0.05	200	200	0.025
6	0.025	200	200	0.0125
7	0.0125	200	200	0.00625
8	0.00625	200	200	0.003125

备注: 实验中每个标准管需 70 μ L 标准溶液。

- 4、样本测定:

试剂名称 (μ L)	基质管	对照管	测定管	标准管	空白管
样本	-	20	20	-	-
蒸馏水	20	40	-	-	-
试剂一	40	-	40	-	-
试剂二	40	40	40	-	-
混匀后, 25°C反应1h					
试剂三	40	40	40	-	-
充分震荡30s, 常温静置5min, 取上清					
上清液	70	70	70	-	-
标准品	-	-	-	70	-
蒸馏水	-	-	-	-	70
工作液	140	140	140	140	140
充分混匀, 常温静置5min, 于微量玻璃比色皿或96孔板中测定540nm各管吸光值, 分别记为A基质管、A对照管、A测定管、A标准管和A空白管, 计算 $\Delta A_{测定} = A_{基质管} - (A_{测定管} - A_{对照管})$, $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管}$ 。空白管、标准管和基质管只需测1-2次, 每个测定管需设一个对照管。					

三、亚硝酸还原酶活性计算

1. 标准曲线的绘制

以标准溶液浓度为 x 轴 (x, $\mu\text{mol/mL}$), 标准溶液对应的 ΔA 标准为 y 轴 (y, ΔA 标准), 建立标准曲线, 得到标准方程 $y=kx+b$, 将 ΔA 测定带入方程得到 x ($\mu\text{mol/mL}$)。

2. 酶活计算

(1) 按照蛋白浓度计算

酶活单位定义: 每mg组织蛋白每小时还原 $1\mu\text{mol NO}_2^-$ 的量为一个酶活力单位。

$$\text{NiR (U/mg prot)} = x \times V1 \div V2 \div \text{Cpr} \div T = x \times 7 \div \text{Cpr}$$

(2) 按照样本质量计算

酶活单位定义: 每g组织每小时还原 $1\mu\text{mol NO}_2^-$ 的量为一个酶活力单位。

$$\text{NiR (U/g 质量)} = x \times V1 \div V2 \times V\text{提} \div W \div T = x \times 7 \div W$$

(3) 按照细菌/细胞数量计算

酶活单位定义: 每 10^4 个细菌/细胞每小时还原 $1\mu\text{mol NO}_2^-$ 的量为一个酶活力单位。

$$\text{NiR (U/}10^4 \text{ 质量)} = x \times V1 \div V2 \times V\text{提} \div \text{细菌/细胞数量} \div T = x \times 7 \div \text{细菌/细胞数量}$$

V1: 取上清液前的反应体系体积, 0.14mL; V2: 加入的样本体积, 0.02mL; V提: 加入的提取液体积, 1.0mL; T: 反应时间, 1h; W: 土样质量, g; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; 细菌/细胞数量: 以 10^4 计。

实验实例:

1、取 0.1g 鸢尾叶片加入 1mL 提取液进行匀浆研磨, 按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 ΔA 测定 = A 基质管 - (A 测定管 - A 对照管) = 1.462 - (1.047 - 0.053) = 0.468, 带入标准曲线 $y = 7.5096x - 0.0005$, 计算 $x = 0.0624$, 按样本质量计算含量得, 按样本质量计算酶活得:

$$\text{NiR (U/g 质量)} = x \times 7 \div W = 0.0624 \times 7 \div 0.1 = 4.367 \text{ U/g 质量。}$$

相关系列产品:

- AC10081/AC10082 硝酸还原酶(NR)活性检测试剂盒
- AC10319/AC10320 水土中亚硝酸盐含量检测试剂盒
- AC10321/AC10322 食品中亚硝酸盐含量检测试剂盒
- AC10323/AC10324 植物硝态氮含量检测试剂盒
- AC10327/AC10328 植物氨态氮含量检测试剂盒
- AC10768/AC10769 硝酸还原酶 (NR) 活性检测试剂盒 (Griess显色法)