

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

分光光度法 50 管/24 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

硝酸还原酶 (NiR) 是一类能催化亚硝酸盐还原的酶，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。

测定原理：

亚硝酸还原酶可将 NO₂⁻还原为 NO，使样品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亚硝酸还原酶的活性。

组成：

产品名称	NM023-50T/24S	Storage
提取液：液体	80ml	4°C
试剂一：液体	10ml	4°C
试剂二：粉剂	1 瓶	4°C
试剂三：液体	12ml	4°C
试剂四：液体	25ml	4°C避光
试剂五：液体	25ml	4°C避光
说明书	一份	

试剂二：粉剂×1 瓶，4°C保存。临用前加 12ml 蒸馏水溶解。

试剂三：液体 12ml×1 瓶，4°C保存。（如出现沉淀可以 70-80°C加热溶解）

试剂四：液体 25ml×1 瓶，4°C避光保存。（如出现沉淀可以 70-80°C加热溶解）

工作液：临用前根据用量将试剂四和试剂五以 1:1 的比例混合。

自备仪器和用品：

天平、研钵、可见分光光度计、水浴锅、低温离心机、1ml 玻璃比色皿。

酶液提取：

1. 组织：按照组织质量 (g) : 提取液体积(ml)为 1: 5~10 的比例（建议称取约 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。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



2. 细菌、真菌：按照细胞数量 (10^4 个) : 提取液体积 (ml) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1ml 提取液), 冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 然后 10000g, 4°C 离心 10min, 取上清置于冰上待测。

测定操作表:

	空白管	对照管	测定管
样本 (μl)		100	100
蒸馏水 (μl)	100	200	
试剂一 (μl)	200		200
试剂二 (μl)	200	200	200
混匀后, 25°C 反应 1h			
试剂三 (μl)	200	200	200
充分震荡 30S			
上清液 (μl)	350	350	350
工作液 (μl)	700	700	700
充分混匀, 蒸馏水调零, 静置 3min 后测定 540nm 处吸光值, 分别记为 A 空白管、A 对照管、A 测定管。空白管只要做一管, 每个测定管需设一个对照管。			

计算公式:

标准曲线: $y = 1.3594x + 0.0072$, $R^2 = 0.9997$; x 为标准品浓度 ($\mu\text{mol/ml}$), y 为吸光值 (A 标准管-A 空白管)。

1. 按照蛋白含量计算

酶活单位定义: 每毫克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。

$$\text{NiR } (\mu\text{mol/h/mg prot}) = [A \text{ 空白管} - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) - 0.0072] \div 1.3594 \times V \text{ 标} \div (V \text{ 样} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1.47 \times (A \text{ 空白管} - A \text{ 测定管} + A \text{ 对照管} - 0.0072) \div C_{\text{pr}}$$

2. 按照样本质量计算

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

$$\text{NiR } (\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [A \text{ 空白管} - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) - 0.0072] \div 1.3594 \times V \text{ 标} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 1.47 \times (A \text{ 空白管} - A \text{ 测定管} + A \text{ 对照管} - 0.0072) \div W$$

3. 按照细胞数量计算

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

$$\text{NiR } (\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}) = [A \text{ 空白管} - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) - 0.0072] \div 1.3594 \times V \text{ 标} \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 1.47 \times (A \text{ 空白管} - A \text{ 测定管} + A \text{ 对照管} - 0.0072) \div \text{细胞数量}$$

V 标: 标准液体积, 0.2ml; V 样: 体系中加入样本体积, 0.1ml; V 样总: 加入提取液体积, 1ml; T: 反应时间, 1h; C_{pr}: 样本蛋白含量; W: 样本质量, g

注意事项:

1. 配制好的工作液 3 天内使用完。



2. 若吸光值超过 3，将上清液进行适当的稀释后再加入工作液显色，并在计算公式中乘以稀释倍数。
3. 严格控制显色时间，否则会对结果有影响。
4. 标准曲线线性范围为 $0.03\mu\text{mol/ml}$ - $1.5\mu\text{mol/ml}$ 。
5. A 空白管- (A 测定管-A 对照管) 线性范围为 0.02-3。

