

亚硝酸还原酶（Nitrite reductase, NiR）试剂盒说明书

（ 分光法 24 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 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 mg×2 支	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部，每支加 1.5mL 提取液溶解， 再用提取液稀释一倍后作为试剂一使用。 一周内用完。
试剂二	粉剂 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加 2mL 提取液溶解。
试剂三	试剂三 A mg×2 支 试剂三 B mg×2 支	4℃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 g×1 瓶	4℃保存	临用前加 3mL 蒸馏水溶解。
试剂五	液体 12mL×1 瓶	4℃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℃保存	
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）、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。4℃×12000g 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）；4℃×12000g 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 可见分光光度计预热 30min，调波长至 540nm，蒸馏水调零。
- ② 在 EP 管中依次加入试剂：

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 EP 管中依次加入:

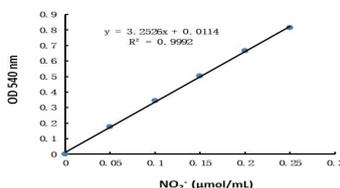
上清液	80	80
蒸馏水	400	400
反应 mix	400	400
混匀, 室温反应 10min, 立即 取全部上清液至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 于 540nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$ (每个测定管需设一个对照管)。		

【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 0.8, 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: $y = 3.2526x + 0.0114$, x 为标准品摩尔浓度 (μmol/mL), y 为吸光值 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。

$$\text{NiR}(\mu\text{mol/h/mg prot}) = [(\Delta A - 0.0114) \div 3.2526 \times V2] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 16.91 \times (\Delta A - 0.0114) \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{NiR}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0114) \div 0.3127 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T = 16.91 \times (\Delta A - 0.0114) \div W$$

4. 按照细胞数量计算:

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。

$$\begin{aligned} \text{NiR}(\mu\text{mol/h} / 10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.0114) \div 0.3127 \times V2] \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \div T \\ &= 16.91 \times (\Delta A - 0.0114) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

V1---体系中加入样本体积, 0.02mL; V---加入提取液体积, 1mL;

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, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒;

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (100μmol/mL): 标准品用 1mL 蒸馏水溶解。(母液在两天内用完)。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25. μmol/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。