

亚硝酸还原酶（Nitrite reductase, NiR）试剂盒说明书

（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℃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 mg×4 支 | 4℃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 mg×1 瓶 | 4℃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℃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 12mL 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：

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℃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℃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（此时反应液应为深蓝色），于 37°C 下反应 30min 后，立即于漩涡震荡仪上剧烈震荡直到颜色完全消失。 | | |
| 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：

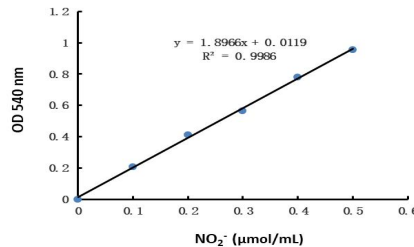
| | | |
|---|-----|-----|
| 上清液 | 20 | 20 |
| 蒸馏水 | 100 | 100 |
| 反应 mix | 100 | 100 |
| 混匀，室温反应 10min，立即于 540nm 处分别读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 对照 - A 测定（每个测定管需设一个对照管）。 | | |

【注】：1. 若 ΔA 值在零附近徘徊，可增加样本体积 V1（如增至 50 μ L 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 10 μ L 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（ μ mol/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 1 μ mol NO₂⁻ 的量为一个酶活力单位。

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

3、按照样本质量计算：

酶活定义：每三克组织每小时还原 1 μ mol 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 1 μ mol 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°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。