

# 亚硝酸还原酶（NiR）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
PMHE2-C24	植物亚硝酸还原酶（NiR）试剂盒	24T	常量法

## 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NO<sub>2</sub><sup>-</sup>还原为NO，使样本中参与重氮化反应生成紫红色化合物的NO<sub>2</sub><sup>-</sup>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。

## 试剂组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 30mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 8mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×2 瓶	2-8℃保存
试剂三	粉剂×1瓶	2-8℃保存
试剂四	液体25mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	液体25mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1mL×1 支	2-8℃保存

## 溶液的配制:

- 1、试剂二：临用前加入6mL 蒸馏水充分溶解，2-8℃保存2 周；
- 2、试剂三：临用前加入 15mL 蒸馏水，可70-80℃加热溶解；2-8℃保存3 个月。
- 3、试剂五：若出现沉淀，可70-80℃加热溶解；
- 4、标准品：10μmol/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。

## 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℃，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℃, 10000g, 离心 10min, 弃沉淀, 取上清液置于冰上待测。

## 二、测定步骤

- 1、分光光度计预热30min 以上, 调节波长至540nm, 蒸馏水调零。
- 2、标准液的稀释：将10 $\mu$ mol/mL的标准溶液用蒸馏水稀释至0.08、0.06、0.05、0.025、0.0125、0.00625、0.003125、0.0015625 $\mu$ 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( $\mu$ mol/mL)	标准液体积( $\mu$ L)	蒸馏水体积( $\mu$ L)	稀释后浓度( $\mu$ mol/mL)
1	10	30	270	1
2	1	80	920	0.08
3	1	60	940	0.06
4	1	50	950	0.05
5	0.05	500	500	0.025
6	0.025	500	500	0.0125
7	0.0125	500	500	0.00625
8	0.00625	500	500	0.003125
9	0.003125	500	500	0.0015625

备注：实验中每个标准管需350 $\mu$ L 标准溶液。

- 4、样本测定：

试剂名称( $\mu$ L)	基质管	对照管	测定管	标准管	空白管
样本	-	100	100	-	-
蒸馏水	100	200	-	-	-
试剂一	200	-	200	-	-
试剂二	200	200	200	-	-
混匀后, 25℃反应1h				-	-
试剂三	200	200	200	-	-
充分震荡30s, 静置5min, 取上清				-	-
上清液	350	350	350	-	-
标准品	-	-	-	350	-
蒸馏水	-	-	-	-	350
工作液	700	700	700	700	700

充分混匀, 静置5min, 于1mL玻璃比色皿中测定540nm各管吸光值, 分别记为A<sub>基质管</sub>、A<sub>对照管</sub>、A<sub>测定管</sub>、A<sub>标准管</sub>和A<sub>空白管</sub>, 计算 $\Delta A_{测定} = A_{基质管} - (A_{测定管} - A_{对照管})$ ,  $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管}$ 。标准曲线、空白管和基质管只需测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 $\Delta A$  标准为y轴 (y,  $\Delta A$  标准), 建立标准曲线, 得到标准方程 $y=kx+b$ , 将 $\Delta A$  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, 0.7mL; V2: 加入的样本体积, 0.1mL; 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。