

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-M48	亚硝酸还原酶（NiR）试剂盒	48T	微量法

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。

试剂组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂一	液体 3mL×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 10mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂五	液体 10mL×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：每瓶临用前加入2.5mL 蒸馏水充分溶解，2-8℃保存2 周；
- 2、试剂三：临用前加入5mL 蒸馏水，可70-80℃加热溶解；2-8℃可以保存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/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: 下述实验中每个标准管需 70 μ L 标准液 (注意不要在此步骤直接检测吸光值)。

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℃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。 $\text{NiR (U/mg prot)} = x \times V_1 \div V_2 \times V_{\text{提}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{提}}) \div T = x \times 7 \div \text{Cpr}$

(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。 $\text{NiR (U/g 质量)} = x \times V_1 \div V_2 \times V_{\text{提}} \div W \div T = x \times 7 \div W$

(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。 $\text{NiR (U/10}^4 \text{ cell)} = x \times V_1 \div V_2 \times V_{\text{提}} \div \text{细菌/细胞数量} \div T = x \times 7 \div \text{细菌/细胞数量}$

V_1 : 取上清液前的反应体系体积, 0.14mL ; V_2 : 加入的样本体积, 0.02mL ; $V_{\text{提}}$: 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。