

亚硝酸还原酶（Nitrite reductase, NiR）试剂盒说明书

（货号：BP10356F-48 分光法 48 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 120mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉体 4 支	4°C保存	每支： 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 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； 3. 一周内用完。
试剂二	粉剂 1 瓶	4°C保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 4mL 提取液溶解； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	试剂三 A mg×2 支 试剂三 B mg×2 支	4°C保存	1. 临用前一支试剂 A 和 B 分别用 1mL 蒸馏水完全溶解； 2. 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 1 瓶	4°C保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 临用前加 6mL 蒸馏水溶解； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	液体 24mL×1 瓶	4°C避光保存	1. 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）； 2. 两天之内用完。
试剂六	液体 24mL×1 瓶	4°C避光保存	
标准品	粉体 1 支	4°C避光保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

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、样本提取：

- 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(10^4 个)：提取液体积(mL)为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、检测步骤：

- ① 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：

试剂组分 (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℃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：

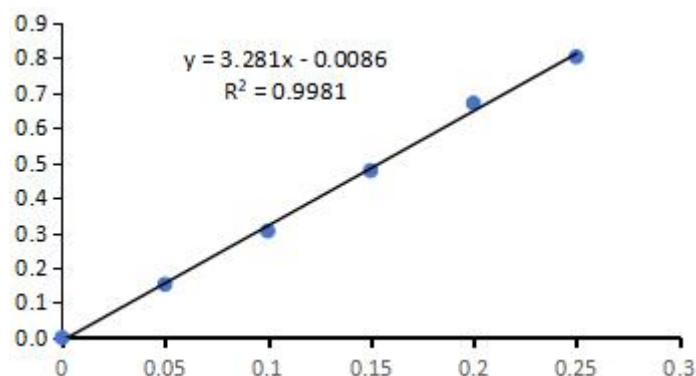
上清液	80	80
蒸馏水	400	400
反应 mix	400	400
混匀，室温反应 10min，立即取全部上清液至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$ （每个测定管需设一个对照管）。		

【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： $y = 3.281x - 0.0086$ ，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 $1\mu\text{mol NO}_2^-$ 的量为一个酶活力单位。

$$\text{NiR}(\mu\text{mol/h/mg prot})=[(\Delta A+0.0086)\div 3.281\times V_2]\div (V_1\times \text{Cpr})\div T=16.76\times (\Delta A+0.0086)\div \text{Cpr}$$

3. 按照样本质量计算：酶活定义：每克组织每小时还原 $1\mu\text{mol NO}_2^-$ 的量为一个酶活力单位。

$$\text{NiR}(\mu\text{mol/h/g 鲜重})=[(\Delta A+0.0086)\div 3.281\times V_2]\div (W\times V_1\div V)\div T=16.76\times (\Delta A+0.0086)\div W$$

4. 按照细胞数量计算：

酶活定义：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。

$$\begin{aligned}\text{NiR}(\mu\text{mol/h}/10^4\text{ cell})&=[(\Delta A+0.0086)\div 3.281\times V_2]\div (\text{细胞数量}\times V_1\div V)\div T \\ &=16.76\times (\Delta A+0.0086)\div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

V_1 ---体系中加入样本体积，0.02mL； V ---加入提取液体积，1mL；

V_2 ---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：

- 标准品用 1mL 蒸馏水溶解。（母液在两天内用完），标准品母液浓度为 $100\mu\text{mol/mL}$ 。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25. $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 标品稀释参照表如下：

1. 吸取标准品母液 40uL，加入 960uL 蒸馏水，混匀得到 $5\mu\text{mol/mL}$ 的标品稀释液；						
2. 吸取 $5\mu\text{mol/mL}$ 的标品稀释液 40uL，加入 960uL 蒸馏水，混匀得到 $0.25\mu\text{mol/mL}$ 的标品稀释液待用。						
标品浓度 $\mu\text{mol/mL}$	0	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 依据显色反应阶段测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	80	
蒸馏水	400	480
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， $\Delta A = A_{\text{测定}} - 0_{\text{浓度管}}$ 。		