

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0481

Size: 100T/48S

亚硝酸还原酶 (NiR) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

硝酸还原酶 (NiR) 是一类能催化亚硝酸盐还原的酶, 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, 从而减少环境中的亚硝态氮的积累, 降低因亚硝酸盐累积而造成的对生物体的毒害作用。

二、测定原理:

亚硝酸还原酶可将 NO₂⁻ 还原为 NO, 使样品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亚硝酸还原酶的活性。

三、需自备的仪器和用品:

天平、低温离心机、研钵、可见分光光度计/酶标仪、微量比色皿/96 孔板、水浴锅。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 112mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂二	液体 1.5mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂三	液体 1mL × 1 支	4°C 保存	
试剂四	粉剂 × 1 支	4°C 避光保存	临用前加 0.6mL 蒸馏水溶解
试剂五	粉剂 × 1 瓶	4°C 避光保存	临用前加 3.2mL 蒸馏水溶解
显色剂 A	液体 2mL × 1 瓶	4°C 避光保存	

显色剂 B	液体 2mL × 1 瓶	4°C 避光保存	
临用前根据用量将显色剂 A 和显色剂 B 以 1:1 的比例混合。			

五、操作步骤：

● 酶液提取

1. 组织：按照组织质量 (g) : 试剂一体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂一) 进行冰浴匀浆, 然后 10000g, 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2. 细菌、真菌：按照细胞数量 (10^4 个) : 试剂一体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一), 冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min) ; 然后 10000g, 4°C, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。

● 测定操作表

	空白管	对照管	测定管
试剂一 (μL)	140	120	110
试剂二 (μL)	12	12	12
试剂三 (μL)	10		10
试剂四 (μL)	6	6	6
试剂五 (μL)	32	32	32
样品 (μL)		30	30
混匀后, 37°C 反应 1h			
显色剂 (μL)	40	40	40
充分混匀, 25°C 静置显色 10min, 蒸馏水调零, 于微量比色皿/96 孔板中测定 540nm 处各管吸光值, 记为 A 空白管、A 对照管和 A 测定管。			

注意：空白管只要做一管

六、计算公式：

- 使用微量比色皿测定的计算公式如下：

标准曲线： $y=0.0136x-0.005$ ， $R^2=0.9981$ ；

1、按照蛋白含量计算

酶活性定义：每毫克组织蛋白每小时还原 $1\ \mu\text{mol NO}^-$ 的量为一个酶活力单位。

$$\text{NiR} (\mu\text{mol/h /mg prot}) = [A \text{ 空白管} - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) + 0.005] \div 0.0136 \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T = 490.2 \times [A \text{ 空白管} - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) + 0.005] \div \text{Cpr}$$

2、按照样本质量计算

酶活性定义：每克组织每小时还原 $1\ \mu\text{mol NO}^-$ 的量为一个酶活力单位。

$$\text{NiR} (\mu\text{mol/h /g 鲜重}) = [A \text{ 空白管} - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) + 0.005] \div 0.0136 \times V \text{ 反总} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 490.2 \times [A \text{ 空白管} - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) + 0.005] \div W$$

3、按照细胞数量计算

酶活性定义：每 10^4 细胞每小时还原 $1\ \mu\text{mol NO}^-$ 的量为一个酶活力单位。

$$\text{NiR} (\mu\text{mol/h /}10^4 \text{ cell}) = [A \text{ 空白管} - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) + 0.005] \div 0.0136 \times V \text{ 反总} \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 490.2 \times [A \text{ 空白管} - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) + 0.005] \div \text{细胞数量}$$

V 反总：反应体系总体积，0.2mL；V 样：体系中加入样本体积，0.03mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；W：样本质量，g；T：反应时间，1h；Cpr：样本蛋白含量。

- 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线： $y=0.0068x-0.005$ ， $R^2=0.9981$ ；

1、按照蛋白含量计算

酶活性定义：每毫克组织蛋白每小时还原 $1 \mu\text{mol NO}^-$ 的量为一个酶活力单位。

$$\text{NiR } (\mu\text{mol/h /mg prot}) = [A \text{ 空白管} - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) + 0.005] \div 0.0068 \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T = 980.4 \times [A \text{ 空白管} - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) + 0.005] \div \text{Cpr}$$

2、按照样本质量计算

酶活性定义：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。

$$\text{NiR } (\mu\text{mol/h /g 鲜重}) = [A \text{ 空白管} - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) + 0.005] \div 0.0068 \times V \text{ 反总} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 980.4 \times [A \text{ 空白管} - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) + 0.005] \div W$$

3、按照细胞数量计算

酶活性定义：每 10^4 细胞每小时还原 $1 \mu\text{mol NO}_2^-$ 的量为一个酶活力单位。

$$\text{NiR } (\mu\text{mol/h /}10^4 \text{ cell}) = [A \text{ 空白管} - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) + 0.005] \div 0.0068 \times V \text{ 反总} \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 980.4 \times [A \text{ 空白管} - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) + 0.005] \div \text{细胞数量}$$

V 反总：反应体系总体积，0.2mL；V 样：体系中加入样本体积，0.03mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；W：样本质量，g；T：反应时间，1h；Cpr：样本蛋白含量。

七、注意事项：

配置好的试剂三、试剂四 3 天内使用完