

上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

亚硝酸还原酶(NiR)检测试剂盒说明书

可见分光光度法

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

产品内容：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体80mL×1瓶	4℃保存	-
试剂二	液体3mL×1瓶	4℃保存	-
试剂三	液体3mL×1瓶	4℃保存	-
试剂四	粉剂×1瓶	4℃避光保存	临用前加2mL蒸馏水溶解
试剂五	粉剂×1瓶	4℃避光保存	临用前加8mL蒸馏水溶解
显色剂A	液体5mL×1瓶	4℃避光保存	-
显色剂B	液体5mL×1瓶	4℃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			

产品说明：

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。

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。

自备实验用品及仪器：

天平、低温离心机、研钵、可见分光光度计、1mL玻璃比色皿、水浴锅。

操作步骤：

一、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℃离心10min，取上清，置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量(10⁴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℃，离心10min，取上清置于冰上待测。

二、测定操作表

	空白管	对照管	测定管
试剂一 (μL)	700	600	550
试剂二 (μL)	60	60	60
试剂三 (μL)	50		50
试剂四 (μL)	30	30	30
试剂五 (μL)	160	160	160
样品 (μL)		150	150
混匀后, 37°C反应1h			
显色剂 (μL)	200	200	200
充分混匀, 25°C静置显色10min, 蒸馏水调零, 于1mL玻璃比色皿中测定540nm 处各管吸光 值, 记为A空白管、A 对照管和A 测定管, 空白管只要做一管。			

计算公式:

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 $1 \mu\text{mol NO}_2^-$ 的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NiR} (\mu\text{mol/h /mg prot}) &= [A_{\text{空白管}} - (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) + 0.005] \div 0.0136 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \\ &\div T \\ &= 490.2 \times [A_{\text{空白管}} - (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) + 0.005] \div \\ &\quad C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

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。

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

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。

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

V反总: 反应体系总体积, 1mL; V样: 体系中加入样本体积, 0.15mL; 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。

注意事项:

1、配置好的试剂三、试剂四3天内使用完。