

## 亚硝酸还原酶（Nitrite reductase, NiR）试剂盒说明书

（货号：ADS-W-N014-96 微板法 96 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 NH<sub>3</sub>，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 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>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 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>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℃保存   | 1. 用前摇匀，且用蒸馏水稀释一倍后做为提取液使用；<br>2. 保存周期与试剂盒有效期相同。                                    |
| 试剂一  | 粉体 4 瓶                       | 4℃保存   | 每瓶：<br>1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）；<br>2. 每瓶加 3mL 提取液溶解；<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。          |
| 试剂二  | 粉剂 1 瓶                       | 4℃保存   | 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）；<br>2. 再加 6mL 提取液溶解；<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。                  |
| 试剂三  | 试剂三 A mg×3 支<br>试剂三 B mg×3 支 | 4℃保存   | 1. 临用前一支试剂 A 和 B 分别用 1mL 蒸馏水完全溶解；<br>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℃保存   | 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）；<br>2. 加入 12mL 蒸馏水溶解；<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。                 |
| 试剂五  | 液体 12mL×1 瓶                  | 4℃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）；<br>2. 两天之内用完。            |
| 试剂六  | 液体 12mL×1 瓶                  | 4℃避光保存 |                                                                                    |
| 标准品  | 粉体 1 支                       | 4℃避光保存 | 1. 若重新做标曲，则用到该试剂；<br>2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制；<br>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）、96 孔板、离心管、酶标仪、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。10000g 4℃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）；10000g 4℃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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm。

② 在 EP 管中加入下列试剂：

| 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 96 孔板中依次加入：

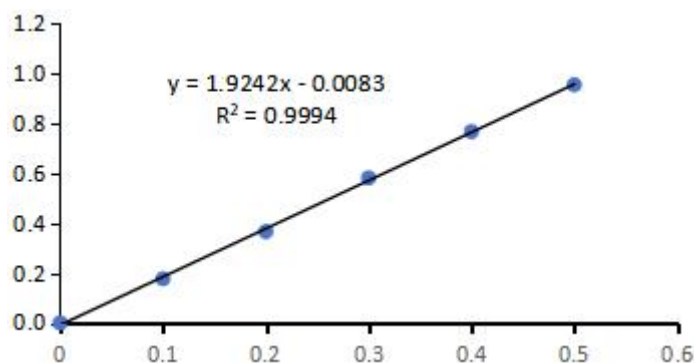
|                                                                                                |     |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 上清液                                                                                            | 20  | 20  |
| 蒸馏水                                                                                            | 100 | 100 |
| 反应 mix                                                                                         | 100 | 100 |
| 混匀，室温反应 10min，立即于 540nm 处分别读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个测定管需设一个对照管）。 |     |     |

【注】：1. 若  $\Delta A$  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.  $\Delta A$  值需小于 1，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： $y = 1.9242x - 0.0083$ ；x 为标准品摩尔浓度 (μmol/mL)，y 为  $\Delta A$ 。



## 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。

$$\text{NiR}(\mu\text{mol/h/mg prot})=[(\Delta A+0.0083)\div 1.9242\times V_2]\div (V_1\times \text{Cpr})\div T=28.6\times (\Delta A+0.0083)\div \text{Cpr}$$

## 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。

$$\text{NiR}(\mu\text{mol/h/g 鲜重})=[(\Delta A+0.0083)\div 1.9242\times V_2]\div (W\times V_1\div V)\div T=28.6\times (\Delta A+0.0083)\div W$$

## 4、按照细菌/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。

$$\begin{aligned}\text{NiR}(\mu\text{mol/h}/10^4\text{ cell})&=[(\Delta A+0.0083)\div 1.9242\times V_2]\div (\text{细胞数量}\times V_1\div V)\div T \\ &=28.6\times (\Delta A+0.0083)\div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1mL；

V1---体系中加入样本体积，0.02mL；

V2--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 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 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, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5.  $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下：

|                                                                                          |     |     |     |     |     |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1. 吸取标准品母液 100uL，加入 900uL 蒸馏水，混匀得到 $10\mu\text{mol/mL}$ 的标品稀释液；                          |     |     |     |     |     |     |
| 2. 吸取 $10\mu\text{mol/mL}$ 的标品稀释液 50uL，加入 950uL 蒸馏水，混匀得到 $0.5\mu\text{mol/mL}$ 的标品稀释液待用。 |     |     |     |     |     |     |
| 标品浓度<br>$\mu\text{mol/mL}$                                                               | 0   | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| 标品稀释液<br>uL                                                                              | 0   | 40  | 80  | 120 | 160 | 200 |
| 水 uL                                                                                     | 200 | 160 | 120 | 80  | 40  | 0   |
| 各标准管混匀待用。                                                                                |     |     |     |     |     |     |

- 3 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 ( $\mu\text{L}$ )                                      | 标准管 | 0 浓度管 (仅做一次) |
|-------------------------------------------------------------|-----|--------------|
| 标品                                                          | 20  |              |
| 蒸馏水                                                         | 100 | 120          |
| 反应 mix                                                      | 100 | 100          |
| 混匀，室温反应 10min，立即于 540nm 处读取吸光值 A，<br>$\Delta A=A$ 测定-0 浓度管。 |     |              |