Nitrite Reductase Activity Assay Kit

亚硝酸还原酶（NiR）试剂盒说明书

货号：BN72639| 方法：可见分光法| 规格：24 样

一、产品简介：

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_3，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_2^-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_2^-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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 mg×2 支	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部，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**。一周内用完。
试剂二	粉剂 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加 2mL 提取液溶解。
试剂三	试剂三 Amg×2 支 试剂三 Bmg×2 支	4℃保存	临用前一支试剂 A 和 B 分别用 1mL 蒸馏水完全溶解，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 g×1 瓶	4℃保存	临用前加 3mL 蒸馏水溶解。
试剂五	液体 12mL×1 瓶	4℃保存	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）**。 两天之内用完。
试剂六	液体 12mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、可调式移液器、天平、研钵、水浴锅、低温离心机。

四、亚硝酸还原酶（NiR）活性测定：

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、样本制备：

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、上机检测：

① 可见分光光度计预热 30min，调波长至 540nm，蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入试剂：

试剂名称（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。		

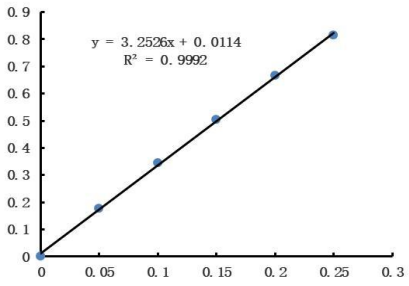
③ 显色反应，在 EP 管中依次加入：

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，△A =A 对照- A 测定（每个测定管需设一个对照管）。		

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算：

1、标准曲线方程：y = 3.2526x + 0.0114，x 为标准品摩尔浓度（μmol/mL），y 为吸光值△A。



标准曲线示意图

说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

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 1μmol $NO2^-$的量为一个酶活力单位。

NiR(μmol/h/mg prot)=[(△A-0.0114)÷3.2526×V2]÷(V1×Cpr)÷T=16.91×(△A-0.0114)÷Cpr

3. 按照样本质量计算：酶活定义：每克组织每小时还原 1μmol NO_2^-的量为一个酶活力单位。

NiR(μmol/h/g 鲜重)=[(△A-0.0114)÷0.3127×V2]÷(W×V1÷V)÷T=16.91×(△A-0.0114)÷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 1μmol NO_2^-的量为一个酶活力单位。

NiR(μmol/h /10^4 cell)=[(△A-0.0114)÷0.3127×V2]÷(细胞数量×V1÷V)÷T

=16.91×(△A-0.0114)÷细胞数量

V1---体系中加入样本体积，0.02mL； V---加入提取液体积，1mL；

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，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒；