



## 亚硝酸还原酶活性检测试剂盒

### NiR Assay Kit

微量法

产品编号：AK385M

产品规格：100T/48S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
ES385	112mL×1 瓶	4℃保存
AK385-A	4mL×1 瓶	4℃保存
AK385-B	粉剂×1 瓶	4℃保存；临用前加 5mL 蒸馏水溶解
AK385-C	5mL×1 瓶	4℃保存；（如出现沉淀可以 70-80℃加热溶解）
AK385-D	10mL×1 瓶	4℃避光保存；（如出现沉淀可以 70-80℃加热溶解）
AK385-E	10mL×1 瓶	4℃避光保存
AK385-标准品	1mL×1 支	4℃保存
工作液：	临用前根据用量将 AK385-D 和 AK385-E 以 1:1 的比例混合	

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

#### 简介：

**意义：**硝酸还原酶（Nitrite reductase, 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 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。

**原理：**亚硝酸还原酶可将 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>还原为 NO，使样品中参与重氮化反应生成紫红色化合物的 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>减少，即 540nm 处吸光值的变化可反应亚硝酸还原酶的活性。

#### 自备用品：

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

#### 酶液提取：

1. 组织：按照组织质量（g）：ES385 体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL ES385），进行冰浴匀浆。10000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量（10<sup>4</sup> 个）：ES385 体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL ES385），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。

#### 测定步骤：

1. 分光光度计预热 30min，调节波长至 540nm，
2. 标准液的稀释：将 10μmol/mL 的标准溶液用蒸馏水等比稀释至 0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、0.03μmol/mL 标准溶液待测。
3. 操作表（在 EP 中加入下列试剂）

试剂名称	基质管（μL）	测定管（μL）	对照管（μL）	空白管（μL）	标准管（μL）
样本		20	20		
蒸馏水	20		40		
AK385-A	40	40			
AK385-B	40	40	40		

	混匀后, 25℃反应 1h				
AK385-C	40	40	40		
	充分震荡 30S				
上清液	70	70	70		
标准溶液					70
蒸馏水				70	
工作液	140	140	140	140	140
充分混匀, 静置 3min 后测定各管 540nm 处吸光值, 分别记为 A 基 质管、A 对照管、A 测定管、A 标准管 和 A 空白管, 计算 $\Delta A$ 测定=A 基质管- (A 测定管-A 对照管), $\Delta A$ 标准=A 标准管-空白管。空白管、标准管 和基质管只需测 1-2 次, 每个测定管需设一个对照管。					

#### NiR 活性计算公式:

##### 1. 标准曲线的绘制

以标准溶液浓度为 x 轴 (x,  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ), 标准溶液对应的  $\Delta A$  标准为 y 轴 (y,  $\Delta A$  标准), 建立标准曲线, 得到标准方程  $y=kx+b$ , 将  $\Delta A$  测定带入方程得到 x ( $\mu\text{mol}/\text{mL}$ )。

##### 2. 酶活计算

###### (1) 按照蛋白浓度计算

酶活单位定义: 每 mg 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。

$$\text{NiR (U/mg prot)} = x \times V1 \div V2 \div \text{Cpr} \div T = x \times 7 \div \text{Cpr}$$

###### (2) 按照样本质量计算

酶活单位定义: 每 g 组织每小时还原  $1\mu\text{mol NO}_2^-$  的量为一个酶活力单位。

$$\text{NiR (U/g 质量)} = x \times V1 \div V2 \times V \text{ 提} \div W \div T = x \times 7 \div W$$

###### (3) 按照细菌/细胞数量计算

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

$$\text{NiR (U}/10^4 \text{ 质量)} = x \times V1 \div V2 \times V \text{ 提} \div \text{细菌/细胞数量} \div T = x \times 7 \div \text{细菌/细胞数量}$$

V1: 取上清液前的反应体系体积, 0.14mL; V2: 加入的样本体积, 0.02mL; V 提: 加入的提取液体积, 1.0mL; T: 反应时间, 1h; W: 土样质量, g; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; 细菌/细胞数量: 以  $10^4$  计。

#### 注意事项:

1. 配制好的工作液 3 天内使用完。
2. 若吸光值超过 1.5, 将上清液进行适当的稀释后再加入工作液显色, 并在计算公式中乘以稀释倍数。
3. 严格控制显色时间, 否则会对结果有影响。