



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

亚硝酸还原酶(NiR)活性检测试剂盒 微板法

货号: R33064

规格: 48T

保存温度: 2-8℃保存, 有效期 3 个月。

产品简介:

亚硝酸还原酶 (NiR, EC1.7.2.1) 是亚硝态氮还原过程中的关键酶, 能催化亚硝酸盐的还原, 在自然界氮素循环过程中发挥着重要作用, 其广泛存在于微生物及植物体内。亚硝酸还原酶可以将亚硝酸盐降解为 NO 或 NH₃, 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 NO₂⁻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 NO₂⁻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。

产品组成:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 105mL×1 瓶	2-8℃保存	
试剂一	粉末×2 支	2-8℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 每支加 3mL 提取液溶解。
试剂二	粉末×1 瓶	2-8℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加 3mL 提取液溶解。
试剂三 A	粉末×2 支	2-8℃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)。
试剂三 B	粉末×2 支	2-8℃保存	
试剂四	粉末×1 瓶	2-8℃保存	临用前加 6mL 蒸馏水溶解。
试剂五	液体 6mL×1 瓶	2-8℃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 6mL×1 瓶	2-8℃保存	
标准品	粉末×1 支	2-8℃保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。



使用方法:

建议正式实验前, 选取 2 个样本做预测定, 了解实验样品情况, 熟悉流程, 避免样本和试剂浪费!

一、样本准备:

1. 组织样本:

(a) 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆;

(b) 12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上测定。

【注】: 根据研究需求, 可按组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 10 的比例进行提取。

2. 细菌/细胞样本:

(a) 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清;

(b) 取 5×10^6 个细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 300w, 超声 3s, 间隔 7s, 总时间 3min);

(c) 12000rpm, 室温离心 10min, 取上清, 置冰上测定。

【注】: 若增加样本量, 可按每 $0.5 \sim 1 \times 10^7$ 个细菌/细胞数量加入 1mL 提取液的比例进行提取。

二、样品测定:

1. 酶标仪预热 30min, 设定波长到 540nm。

2. 在离心管中依次加入:

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 (此时反应液应为深蓝色), 于 37℃下反应 30min 后, 立即于漩涡震荡仪上剧烈震荡直到颜色完全消失。		
试剂四	50	50
混匀, 12000rpm, 室温离心 5min, 上清液待测。		



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

3. 显色反应，在离心管中依次加入：

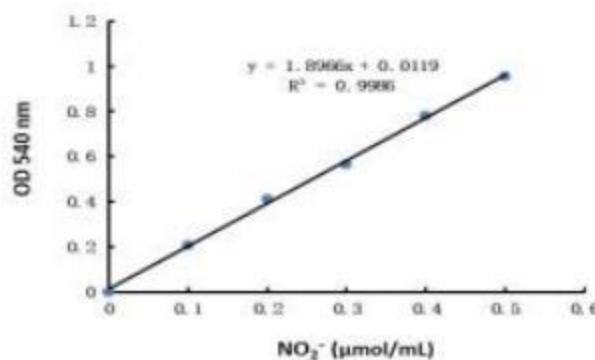
上清液	20	20
蒸馏水	100	100
反应 mix	100	100
混匀，室温反应 10min，立即取全部上清液至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$ （每个测定管需设一个对照管）。		

【【注】】：1. 若 ΔA 值在零附近徘徊，可增加样本体积 V_1 （如增至 50 μL 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 V_1 或 T 代入计算公式重新计算。

2. ΔA 值需小于 1，若大于则需减少样本体积 V_1 （如减至 10 μL 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 V_1 或 T 代入计算公式重新计算。

三、结果计算

1. 标准曲线方程： $y = 1.8966x + 0.0119$ ； x 为标准品摩尔浓度（ $\mu\text{mol/mL}$ ）， y 为 ΔA 。



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。

$$\text{NiR}(\mu\text{mol/h/mg prot}) = [(\Delta A - 0.0119) \div 1.8966 \times V_2] \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T = 29 \times (\Delta A - 0.0119) \div C_{\text{pr}}$$

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。



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

$$\text{NiR}(\mu\text{mol/h/g 鲜重})=[(\Delta A-0.0119)\div 1.8966\times V_2]\div (W\times V_1\div V)\div T=29\times (\Delta A-0.0119)\div W$$

4. 按照细胞数量计算:

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

$$\text{NiR}(\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell})=[(\Delta A-0.0119)\div 1.8966\times V_2]\div (\text{细胞数量}\times V_1\div V)\div T$$

$$=29\times (\Delta A-0.0119)\div \text{细胞数量}$$

V--提取液体积, 1 mL

V1--加入样本体积, 0.02mL

V2--反应总体积, 0.55mL

T---反应时间, 30min=1/2h

细胞数量---500 万

W--样本质量, g

Cpr---上清液蛋白质浓度 (mg/mL)

附: 标准曲线制作过程:

1. 制备标准品母液 ($100\mu\text{mol/mL}$): 标准品用 1mL 蒸馏水溶解。(母液在两天内用完)。

2. 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品: 0,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5.
 $\mu\text{mol/mL}$ 。

3. 按照显色反应阶段的加样顺序操作: 根据结果即可制作标准曲线。

注意事项:

1、 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品。

2、 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。