



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

亚硝酸还原酶活性检测试剂盒(微量法)

货号: R42028

规格: 100T/48S

有效期: 6个月

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES385	112mL×1瓶	2-8℃保存
试剂-A	4mL×1瓶	2-8℃保存
试剂-B	粉剂×1瓶	2-8℃保存; 临用前加5mL蒸馏水溶解
试剂-C	5mL×1瓶	2-8℃保存; (如出现沉淀可以70-80℃加热溶解)
试剂-D	10mL×1瓶	2-8℃避光保存; (如出现沉淀可以70-80℃加热溶解)
试剂-E	10mL×1瓶	2-8℃避光保存
标准品	1mL×1支	2-8℃保存
工作液:	临用前根据用量将试剂-D和试剂-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 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。

原理: 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。

粗酶液提取:



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 (10^4 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 $10\mu\text{mol/mL}$ 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、 $0.03\mu\text{mol/mL}$ 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		
试剂-A	40	40			
试剂-B	40	40	40		
	混匀后, 25℃反应1h				
试剂-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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{基质管}} - (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}})$, $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。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。					

注: 对照管和标准曲线各只要做 1-2 次。

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

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 ;
 $V_{\text{提}}$: 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。