



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 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、微量玻璃比色皿/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 (10⁴ 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 $\Delta A_{测定} = A_{基质管} - (A_{测定管} - A_{对照管})$, $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管}$ 。 注: 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, $\mu\text{mol/mL}$), 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。

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

(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。

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

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. 若吸光值超过线性范围, 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。