

亚硝酸还原酶（Nitrite reductase, NiR）试剂盒说明书

微量法 100T/48S

注 意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

硝酸还原酶（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。

测定原理：

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映亚硝酸还原酶的活性。

需自备的仪器和用品：天平、研钵、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、水浴锅、低温离心机。

试剂的组成和配制：

提取液：液体 112mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 4mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加 5mL 蒸馏水溶解。

试剂三：液体 5mL×1 瓶，4℃ 保存。（如出现沉淀可以 70-80℃ 加热溶解）

试剂四：液体 10mL×1 瓶，4℃ 避光保存。（如出现沉淀可以 70-80℃ 加热溶解）

试剂五：液体 10mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

工作液：临用前根据用量将试剂四和试剂五以 1:1 的比例混合。

酶液提取：

1. 组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），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）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），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。

测定操作表：

	空白管	对照管	测定管
样本（μL）		20	20
蒸馏水（μL）	20	40	
试剂一（μL）	40		40
试剂二（μL）	40	40	40

混匀后, 25℃反应 1h			
试剂三 (μL)	40	40	40
充分震荡 30S			
上清液 (μL)	70	70	70
工作液 (μL)	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 空白管、A 对照管、A 测定管。空白管只要做一管, 每个测定管需设一个对照管。			

计算公式:

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线: $y = 1.3594x + 0.0072$, $R^2 = 0.9997$; x 为标准品浓度 ($\mu\text{mol/mL}$), y 为吸光值 (A 标准管-A 空白管)。

1. 按照蛋白含量计算

酶活单位定义: 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。

$$\text{NiR } (\mu\text{mol/h /mg prot}) = [A \text{ 空白管} - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) - 0.0072] \div 1.3594 \times V \text{ 标} \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T = 1.47 \times (A \text{ 空白管} - A \text{ 测定管} + A \text{ 对照管} - 0.0072) \div \text{Cpr}$$

2. 按照样本质量计算

酶活单位定义: 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。

$$\text{NiR } (\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [A \text{ 空白管} - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) - 0.0072] \div 1.3594 \times V \text{ 标} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 1.47 \times (A \text{ 空白管} - A \text{ 测定管} + A \text{ 对照管} - 0.0072) \div W$$

3. 按照细胞数量计算

酶活单位定义: 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。

$$\text{NiR } (\mu\text{mol/h /} 10^4 \text{ cell}) = [A \text{ 空白管} - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) - 0.0072] \div 1.3594 \times V \text{ 标} \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 1.47 \times (A \text{ 空白管} - A \text{ 测定管} + A \text{ 对照管} - 0.0072) \div \text{细胞数量}$$

V 标: 标准液体积, 0.04mL; V 样: 体系中加入样本体积, 0.02mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 1h; Cpr: 样本蛋白含量; W: 样本质量, g

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线: $y = 0.6797x + 0.0072$, $R^2 = 0.9997$; x 为标准品浓度 ($\mu\text{mol/mL}$), y 为吸光值 (A 标准管-A 空白管)。

1. 按照蛋白含量计算

酶活单位定义: 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。

$$\text{NiR } (\mu\text{mol/h /mg prot}) = [A \text{ 空白管} - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) - 0.0072] \div 0.6797 \times V \text{ 标} \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T = 2.94 \times (A \text{ 空白管} - A \text{ 测定管} + A \text{ 对照管} - 0.0072) \div \text{Cpr}$$

2. 按照样本质量计算

酶活单位定义: 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。

$$\text{NiR } (\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [A \text{ 空白管} - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) - 0.0072] \div 0.6797 \times V \text{ 标} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 2.94 \times (A \text{ 空白管} - A \text{ 测定管} + A \text{ 对照管} - 0.0072) \div W$$

3. 按照细胞数量计算

酶活单位定义: 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。

$$\text{NiR } (\mu\text{mol/h /} 10^4 \text{ cell}) = [A \text{ 空白管} - (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) - 0.0072] \div 0.6797 \times V \text{ 标} \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 2.94 \times (A \text{ 空白管} - A \text{ 测定管} + A \text{ 对照管} - 0.0072) \div \text{细胞数量}$$

V 标: 标准液体积, 0.04mL; V 样: 体系中加入样本体积, 0.02mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 1h; Cpr: 样本蛋白含量; W: 样本质量, g

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。
4. 标准曲线线性范围为 0.03 μ mol/mL-1.5 μ mol/mL。
5. A 空白管- (A 测定管-A 对照管) 线性范围为 0.02-1.5。