

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°C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。

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

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。

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

3. 按照细胞数量计算

酶活单位定义: 每104个细胞每小时还原 $1\mu\text{mol NO}_2^-$ 的量为一个酶活力单位。

$$\text{NiR } (\mu\text{mol/h} / 104 \text{ cell}) = [\text{A空白管} - (\text{A测定管} - \text{A对照管}) - 0.0072] \div 1.3594 \times V_{\text{标}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.47 \times (\text{A空白管} - \text{A测定管} + \text{A对照管} - 0.0072) \div \text{细胞数量}$$

$V_{\text{标}}$: 标准液体积, 0.04mL; $V_{\text{样}}$: 体系中加入样本体积, 0.02mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; T : 反应时间, 1h; C_{pr} : 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。

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

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。

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

3. 按照细胞数量计算

酶活单位定义：每104个细胞每小时还原 $1\mu\text{mol NO}_2^-$ 的量为一个酶活力单位。

$$\text{NiR } (\mu\text{mol/h /104 cell}) = [\text{A空白管}-(\text{A测定管}-\text{A对照管})-0.0072] \div 0.6797 \times \text{V标} \div (\text{细胞数量} \times \text{V样} \div \text{V样总}) \div \text{T} = 2.94 \times (\text{A空白管}-\text{A测定管}+\text{A对照管}-0.0072) \div \text{细胞数量}$$

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 $0.03\mu\text{mol/mL}$ - $1.5\mu\text{mol/mL}$ 。
5. A空白管-（A测定管-A对照管）线性范围为0.02-1.5。