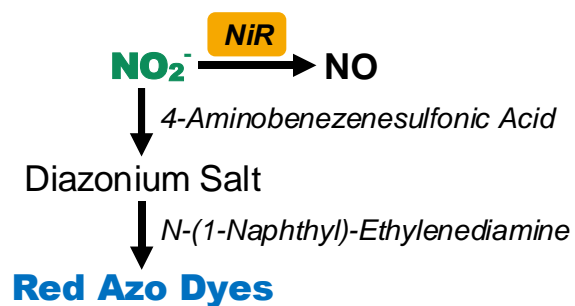




亚硝酸还原酶 (NiR) 活性检测试剂盒
Nitrite Reductase (NiR) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



亚硝酸还原酶 (NiR) 活性检测试剂盒

Nitrite Reductase (NiR) Activity Assay Kit

一、产品描述

亚硝酸还原酶 (NiR) 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, 降低因其而造成的毒害作用。

亚硝酸还原酶能够将 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, 重氮化反应产物在 540 nm 处具有特征吸收峰, 通过吸光值变化即可表征亚硝酸还原酶的活性。

二、产品内容

名称		试剂规格	储存条件	使用说明及注意事项
提取液		液体 60 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一		液体 4 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二		粉剂×2 瓶	4°C 保存	使用前每瓶加入 3 mL 蒸馏水充分溶解 (4°C 可保存 2 周, 使用完成后及时置于 4°C 保存)
试剂三		液体 6 mL×1 瓶	4°C 保存	-
显色液	A 液	液体 10 mL×1 瓶	4°C 避光保存	使用前按照 A 液:B 液=1:1 体积比配制 (根据使用量现用现配, 配制后 48 h 内有效)
	B 液	液体 10 mL×1 瓶	4°C 避光保存	
标准液		液体 1 mL×1 支	4°C 保存	10 μmol/mL 亚硝酸钠标准液
标准稀释液的制备 (现用现配): 使用前将 10 μmol/mL 亚硝酸钠标准液使用蒸馏水稀释至 0.5、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025 μmol/mL 即为标准稀释液。				

注: 若试剂三和显色液 A 液出现沉淀属正常现象, 60-80°C 加热溶解后使用即可。

序号	A	1	2	3	4	5	6
稀释前浓度 (μmol/mL)	10	1.0	1.0	1.0	0.2	0.1	0.05
标准液体积 (μL)	100	200	200	100	200	200	200
蒸馏水体积 (μL)	900	200	300	400	200	200	200
稀释后浓度 (μmol/mL)	1.0	0.5	0.4	0.2	0.1	0.05	0.025

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：酶标仪、96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量和比例）

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 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4°C 10000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为（500-1000）：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴超声破碎（功率 300 W，超声 3 s，间隔 7 s，总时间 3 min），4°C 10000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

2.测定步骤

①酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 540 nm。

②在离心管中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	对照组 (μL)	基质组 (μL)	标准组 (μL)	空白组 (μL)
粗酶液	20	20	-	-	-
蒸馏水	-	40	20	-	-
试剂一	40	-	40	-	-
试剂二	40	40	40	-	-
充分混匀，25°C 准确反应 1 h					
试剂三	40	40	40	-	-
充分振荡 60 s，4°C 10000 g 离心 10 min，取上清液					
在 96 孔板中依次加入下列试剂：					
上清液	70	70	70	-	-
标准稀释液	-	-	-	70	-
蒸馏水	-	-	-	-	70
显色液	140	140	140	140	140

吸光值测定：测定 540 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 基质、A 标准和 A 空白；计算 ΔA 测定 = A 基质 - (A 测定 - A 对照)， ΔA 标准 = A 标准 - A 空白。注：每个样品均需设一个对照组，各浓度标准组、基质组和空白组只需测定 1-2 次。

标准曲线的建立：以 0.5、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025 $\mu\text{mol/mL}$ 为横坐标 (x)，其对应的 ΔA 标准为纵坐标 (y)，绘制标准曲线，得到线性回归方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 测定代入方程得到 x ($\mu\text{mol/mL}$)。

3. 亚硝酸还原酶 (NiR) 活性计算

① 按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每小时还原 1 $\mu\text{mol NO}_2^-$ 所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{NiR (U/mg prot)} = \frac{x \times V_{\text{酶促}}}{V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} = \frac{7 \times x}{\text{Cpr}}$$

② 按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每小时还原 1 $\mu\text{mol NO}_2^-$ 所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{NiR (U/g)} = \frac{x \times V_{\text{酶促}} \times V_{\text{提}}}{V_{\text{样}} \times W \times T} = \frac{7 \times x}{W}$$

③ 按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 细菌或细胞每小时还原 1 $\mu\text{mol NO}_2^-$ 所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{NiR (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{x \times V_{\text{酶促}} \times V_{\text{提}}}{V_{\text{样}} \times \text{细菌或细胞数量} \times T} = \frac{7 \times x}{\text{细菌或细胞数量}}$$

注释： V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.02 mL；V 酶促：酶促反应总体积，0.14 mL（离心前体系为酶促反应体系）；V 提：粗酶液总体积，1 mL；W：样本质量，g；Cpr：粗酶液蛋白浓度，mg/mL；细菌或细胞数量：以万计；T：酶促反应时间，1 h。

四、注意事项

① 若 ΔA 测定超出标准线性吸光值范围：高于最高值建议适当增加样本量后再进行测定，低于最低值建议将粗酶液适当稀释后再进行测定，计算时相应修改；

② 为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.

Liaodong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

