# Nitrite Reductase Activity Assay Kit

# 亚硝酸还原酶（NiR）试剂盒说明书

货号：BN72638 | 方法：微板法| 规格：96 样

## 一、产品简介：

亚硝酸还原酶（NiR，EC1.7.2.1）是一类能催化亚硝酸盐还原的氧化还原酶，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 $NH_3$，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。

亚硝酸还原酶可将 $NO_2^-$还原为 NO，使样品中参与对–氨基苯磺酸及α-萘胺定量生成（粉）红色偶氮化合物的 $NO_2^-$减少，根据颜色深浅即 540nm 处吸光值的变化可反应亚硝酸还原酶的活性。

## 二、试剂盒的组成和配制：

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|---|---|---|---|
| 提取液 | 液体 120mL×1 瓶 | 4℃保存 | **用前摇匀，且用蒸馏水稀释一倍后做为提取液使用。** |
| 试剂一 | 粉体 mg×4 支 | 4℃保存 | 临用前甩几下使粉体落入底部，每支加 3mL 提取液溶解。 |
| 试剂二 | 粉剂 mg×1 瓶 | 4℃保存 | 临用前甩几下使粉体落入底部，再加 6mL 提取液溶解。 |
| 试剂三 | 试剂三 Amg×3 支<br>试剂三 Bmg×3 支 | 4℃保存 | 临用前一支试剂 A 和 B 分别用 1mL 蒸馏水完全溶解，再把 1mL 试剂 B 倒入 1mL 试剂 A 中混成**试剂三 mix**(一周内用完)。 |
| 试剂四 | 粉体 g×1 瓶 | 4℃保存 | 临用前加 12mL 蒸馏水溶解。 |
| 试剂五 | 液体 12mL×1 瓶 | 4℃保存 | 临用前，可依据待检测样本数量，把试剂五和六等比例混合成**无色**的反应 **mix（注意观察，若变粉色，则不能使用）**。 两天之内用完。 |
| 试剂六 | 液体 12mL×1 瓶 | 4℃保存 | |
| 标准品 | 粉体 mg×1 支 | 4℃保存 | 若重新做标曲，则用到该试剂。 |

## 三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、天平、研钵、水浴锅、低温离心机。

## 四、亚硝酸还原酶（NiR）活性测定：

**建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！**

### 1、样本制备：

① 组织样本：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/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液；超声波破碎细菌或细胞（冰浴，300W，超声 3s，间隔 7s，总时间 3min）；10000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

**【注】：若增加样本量，按照细菌/细胞数量($10^4$个)：提取液体积(mL)为 500~1000：1 的比例进行提取。**

### 2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm。

② 在 EP 管中加入下列试剂：

| 试剂名称（μL） | 测定管 | 对照管 |
|---|---|---|
| 试剂一 | 50 | 50 |
| 试剂二 | 50 | |
| 提取液 | 330 | 430 |
| 样本 | 20 | 20 |
| **试剂三 mix** | 50 | |
| 混匀，于 37℃下反应 30min 后，**务必**于漩涡震荡仪上剧烈震荡 5min。 | | |
| 试剂四 | 50 | 50 |
| 混匀，12000rpm，室温离心 5min，上清液待测。 | | |

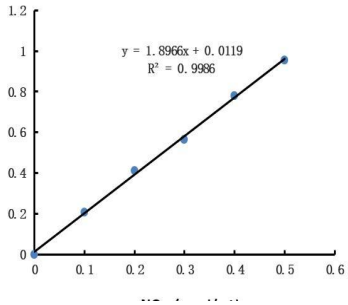
③ 显色反应，在 96 孔板中依次加入：

| | | |
|---|---|---|
| 上清液 | 20 | 20 |
| 蒸馏水 | 100 | 100 |
| 反应 **mix** | 100 | 100 |
| 混匀，室温反应 10min，**立即**于 540nm 处分别读取吸光值 A，△A =A 对照- A 测定（每个测定管需设一个对照管）。 | | |

**注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。**

## 五、结果计算：

1、标准曲线方程：y = 1.8966x + 0.0119；x 为标准品摩尔浓度（μmol/mL），y 为△A。




标准曲线示意图

**说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。**

2、按照蛋白含量计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每小时还原 1μmol $NO_2^-$的量为一个酶活力单位。

NiR(μmol/h/mg prot)=[(△A-0.0119)÷1.8966×V2]÷(V1×Cpr)÷T=29×(△A-0.0119)÷Cpr

3、按照样本质量计算：

酶活定义：每克组织每小时还原 1μmol $NO_2^-$的量为一个酶活力单位。

NiR(μmol/h/g 鲜重)=[(△A-0.0119)÷1.8966×V2]÷(W×V1÷V)÷T=29×(△A-0.0119)÷W

4、按照细菌/细胞数量计算：

酶活定义：每 $10^4$ 个细胞每小时还原 1μmol $NO_2^-$的量为一个酶活力单位。

NiR（μmol/h/$10^4$ cell)=[(△A-0.0119)÷1.8966×V2]÷(细胞数量×V1÷V)÷T

=29×(△A-0.0119)÷细胞数量

V---加入提取液体积，1mL；　　V1---体系中加入样本体积，0.02mL；

V2--反应阶段总体积，0.55mL；　　T---反应时间，30min=1/2h；　细胞数量---500 万；

W---样本质量，g；　Cpr---样本蛋白含量，建议使用本公司 BCA 蛋白含量检测试剂盒。