

# 亚硝酸还原酶(NiR)检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1070BKM

保存：-20℃避光保存 12 个月

规格：48T/24S 96T/48S

适用样本：植物组织、藻类、细菌、真菌、含菌水样等液体样本

## 产品简介

亚硝酸还原酶（Nitrite reductase, NiR）是一类能催化亚硝酸盐还原的酶，是亚硝态氮还原过程中的关键酶。NiR 广泛存在于微生物及植物体内，在自然界氮素循环过程中发挥着重要作用，可以将亚硝酸盐降解为 NO 或 NH<sub>3</sub>，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。本试剂盒提供了一种简单的比色法来检测 NiR。其原理是亚硝酸盐（NO<sub>2</sub><sup>-</sup>）能够在酸性条件下，与对-氨基苯磺酸及 α-萘胺定量生成红色偶氮化合物；生成的红色偶氮化合物在 540nm 有最大吸收峰。亚硝酸还原酶可将 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 还原为 NO，使样本中参与重氮化反应生成紫红色化合物的 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 减少，即 540nm 处吸光值减少。通过测定 540nm 处的吸光值的变化可反映亚硝酸还原酶的活性。

## 产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液	56mL	112mL	4℃ 保存
试剂一	2mL	4mL	-20℃，避光保存
试剂二	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	4℃ 保存
试剂三	2.5mL	5mL	4℃ 保存
试剂四	5mL	10mL	4℃，避光保存
试剂五	5mL	10mL	4℃，避光保存
标准品（1M NaNO <sub>2</sub> ）	1mL	1mL	-20℃，避光保存

## 自备耗材

酶标仪或分光光度计（能测 540nm 处的吸光值）以及恒温箱

96 孔板或微量比色皿、可调节式移液枪及枪头

低温离心机、制冰机

去离子水

匀浆器（如果是组织样本）

## 试剂准备

提取液：即用型；4℃ 保存。

试剂一：即用型；使用前平衡到室温；-20℃ 避光保存。

试剂二：临用前 48T 加 2.5mL 去离子水，96T 加 5mL 去离子水溶解；4℃ 保存一个月或分装 -20℃ 长期保存。

试剂三：即用型；使用前平衡到室温；4℃ 保存。如出现沉淀可以 70-80℃ 加热溶解

试剂四：即用型；使用前平衡到室温；实验过程中避光放置；避光 4℃ 保存。

试剂五：即用型；使用前平衡到室温；实验过程中避光放置；避光 4℃ 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。

## 产品说明书

标准品：含 1M NaNO<sub>2</sub>，使用前平衡到室温；分装-20℃避光保存。

标准曲线设置：取 10μL NaNO<sub>2</sub> 标准品（1M）用 990μL 去离子水稀释至 10mM NaNO<sub>2</sub>。取 80μL 10mM 的 NaNO<sub>2</sub> 用 920μL 去离子水稀释至 0.8mM NaNO<sub>2</sub>。用 0.8mM NaNO<sub>2</sub> 按下表所示，进行下一步稀释：

	标准品体积 (μL)	去离子水体积 (μL)	浓度 (mM)
Std. 1	400μL 0.8mM NaNO <sub>2</sub>	0	0.8
Std. 2	200μL of Std. 1	200	0.4
Std. 3	200μL of Std. 2	200	0.2
Std. 4	200μL of Std. 3	200	0.1
Std. 5	200μL of Std. 4	200	0.05
Std. 6	200μL of Std. 5	200	0.025
Std. 7	200μL of Std. 6	200	0.0125

注意：标准品现配现用；稀释后的标准溶液不稳定，必须在 4 小时内使用。

### 样本制备

组织：称取 0.1g 样本，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆。10,000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上检测。

细菌或真菌：先收集 500 万细菌或真菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，离心后弃上清，加入 1mL 预冷的提取液，冰浴超声波破碎细胞 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），然后；10,000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

含菌水样：取 1mL 水样，研磨仪（球磨仪）研磨，时间 60 秒，循环 2-3 次或冰浴超声波破碎细胞 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），然后；10,000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

### 实验步骤

1. 酶标仪或分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 540nm，分光光度计去离子水调零。
2. 样本测定（在 EP 管中操作）：

试剂名称	测定管	对照管	标准管	空白管
样本 (μL)	20	20	0	0
标准液 (μL)	0	0	20	0
去离子水 (μL)	0	40	80	100
试剂一 (μL)	40	40	0	0
试剂二 (μL)	40	0	0	0
混匀后，25℃反应 1h				
试剂三 (μL)	40	40	0	0
去离子水 (μL)	0	0	40	40
充分震荡 30S，10,000g，4℃，离心 10min，取上清液加入 96 孔板或微量玻璃比色皿中				
上清液 (μL)	70	70	70	70
工作液 (μL)	140	140	140	140

充分混匀，37℃孵育 30min 后测定 540nm 处吸光值，计算  $\Delta A_{测} = A_{对照} - A_{测定}$ ， $\Delta A_{标} = A_{标准} - A_{空白}$ 。每个测定管需设一个对照，标准曲线和空白只需要测一次。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果  $\Delta A_{测}$  小于 0.005 可适当加大样本量。如果  $\Delta A_{测}$  大于 1.5，样本可用去离子水进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量。

## 产品说明书

### 结果计算

#### 1. 标准曲线的绘制

以标准溶液浓度为 y 轴， $\Delta A_{\text{标}}$  为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。将样本的  $\Delta A_{\text{测}}$  代入方程得到 y 值（ $1\text{mM}=1\text{mmol/L}=1\ \mu\text{mol/mL}$ ）。

#### 2. NiR 活性计算：

##### （1）按样本鲜重计算：

单位定义：每 g 鲜重样品在反应体系中每小时催化产生  $1\ \mu\text{mol NO}_2^-$  的量为一个活力单位 U。

$\text{NiR (U/g 鲜重)} = y \times V_{\text{反应}} \times \text{稀释倍数} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 10y \div W$

##### （2）按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每小时催化产生  $1\ \mu\text{mol NO}_2^-$  的量为一个活力单位 U。

$\text{NiR (U/mg prot)} = y \times V_{\text{反应}} \times \text{稀释倍数} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 10y \div \text{Cpr}$

##### （3）按细菌数量计算：

单位定义：每  $10^4$  个细菌在反应体系中每小时催化产生  $1\ \mu\text{mol NO}_2^-$  的量为一个活力单位 U。

$\text{NiR (U}/10^4 \text{ Cells)} = y \times V_{\text{反应}} \times \text{稀释倍数} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 0.02y$

##### （4）按液体体积计算：

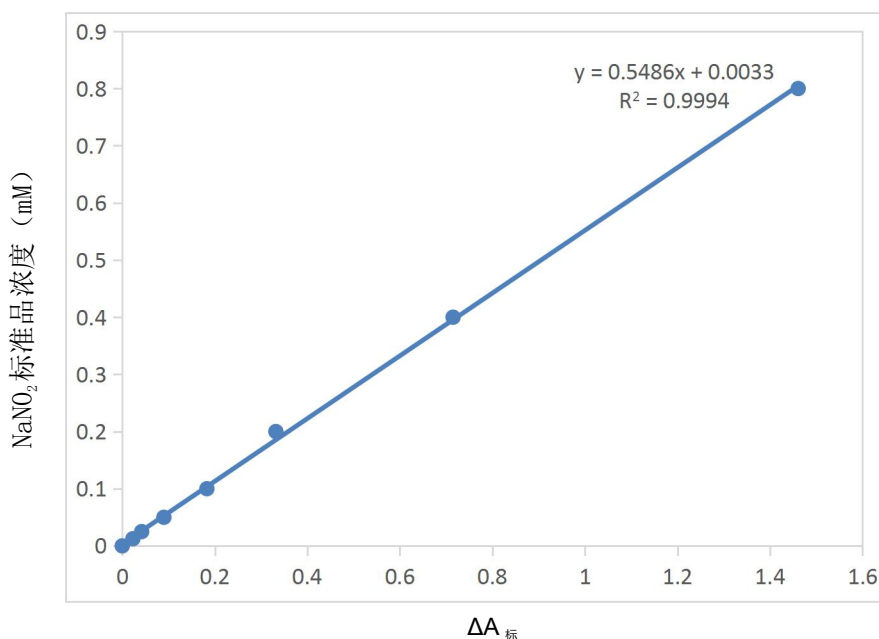
单位定义：每 mL 样本在反应体系中每小时催化产生  $1\ \mu\text{mol NO}_2^-$  的量为一个活力单位 U。

$\text{NiR (U/mL)} = y \times V_{\text{反应}} \times \text{稀释倍数} \div V_{\text{样}} \div T = 10y$

$V_{\text{反应}}$ ：反应体系总体积， $100\ \mu\text{L}=0.1\text{mL}$ ；稀释倍数： $(20+40+40+40) \div 70=2$ ； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积： $0.02\text{mL}$ ； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积， $1\text{mL}$ ；T：反应时间， $1\text{h}$ ；Cpr：样本蛋白质浓度， $\text{mg/mL}$ ；W：样本鲜重，g；500：细菌数量， $5 \times 10^6$ 。

### 结果展示

典型标准曲线-以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



### 注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

## 产品说明书

### 相关产品：

PMK1833BKM 土壤亚硝酸还原酶(S-NiR)检测试剂盒(微量法)  
PMK1825BKM 土壤硝酸还原酶(S-NR)检测试剂盒(微量法)  
PMK1069BKM 硝酸还原酶(NR)检测试剂盒(NADH速率法/微量法)  
PMK1074BKM NO检测试剂盒(微量法)

更多产品详情了解，请关注公众号：

