

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K863-M

产品规格: 96T(38 samples)

检测仪器: 酶标仪(530-550 nm)

## Elabscience®亚硝酸还原酶(NiR)比色法测试盒

Nitrite Reductase(NiR) Activity

Colorimetric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: [biochemical@elabscience.cn](mailto:biochemical@elabscience.cn)

网址: [www.elabscience.cn](http://www.elabscience.cn)

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

## 用途

本试剂盒适用于检测植物组织中亚硝酸还原酶 (NiR) 的活性。

## 检测原理

亚硝酸还原酶 (NiR) 可将  $\text{NO}_2^-$  还原为  $\text{NO}$ ，使样本中参与重氮化反应生成紫红色化合物的  $\text{NO}_2^-$  减少，即 540 nm 处吸光值的变化可反映样本中亚硝酸还原酶的活性。

本试剂盒检测植物组织样本时，可测定总蛋白浓度，推荐使用本公司考马斯亮蓝法 (货号 E-BC-K168-M) 进行测定。

## 提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extraction Solution)	55 mL×2 瓶	2-8°C 避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 A (Buffer A)	24 mL×1 瓶	2-8°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	缓冲液 B (Buffer B)	24 mL×1 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	底物 A (Substrate A)	粉剂×2 瓶	2-8°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent5)	底物 B (Substrate B)	粉剂×6 支	2-8°C 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent6)	显色剂 A (Chromogenic Agent A)	10 mL×1 瓶	2-8°C 避光 保存 6 个月
试剂七 (Reagent7)	显色剂 B (Chromogenic Agent B)	10 mL×1 瓶	2-8°C 避光 保存 6 个月
试剂八 (Reagent8)	标准品 (Standard)	粉剂×1 支	2-8°C 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	1 板	
	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。对于粉剂，使用前请先离心，以免造成试剂损失。

## 所需自备物品

仪器：酶标仪（530-550 nm，最适检测波长 540 nm），恒温箱

## 试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至25°C。

② 试剂八工作液的配制：

取一支试剂八，加入2 mL超纯水，充分混匀溶解，2-8°C避光保存2周。

③ 试剂四工作液的配制：

取一瓶试剂四，加入12 mL试剂二，9.6  $\mu\text{L}$ 的试剂八工作液，充分混匀，2-8°C避光保存2周。

④ 试剂五工作液的配制：

取一支试剂五用4 mL试剂三溶解，现配现用，当天使用有效。

⑤ 显色工作液的配制：

按照试剂六：试剂七= 1:1的体积比配制，充分混匀，按需配制，现用现配，2-8°C避光保存1天。

⑥ 0.2  $\mu\text{mol/mL}$ 标准品的配制：

按照试剂八工作液：超纯水= 1：249的体积比配制，充分混匀，按需配制，现用现配。

⑦ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度( $\mu\text{mol/mL}$ )	0	0.025	0.05	0.10	0.12	0.14	0.16	0.2
0.2 $\mu\text{mol/mL}$ 标准品( $\mu\text{L}$ )	0	62.5	125	250	300	350	400	500
试剂一( $\mu\text{L}$ )	500	437.5	375	250	200	150	100	0

## 样本准备

### ① 样本处理

按照样本质量 (g) : 试剂一体积 (mL) = 1:9的比例匀浆 (如称取0.1 g 的组织样本, 加入0.9 mL的试剂一)。4°C, 10000 ×g离心10 min, 取上清置于冰上待测。留取部分上清用于蛋白浓度测定。

### ② 样本的稀释

在正式检测前, 需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验, 根据预实验的结果, 结合本试剂盒的线性范围: 0.045-9 μmol/h/g, 请参考下表稀释(仅供参考):

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%玉米组织	不稀释	10%青椒组织	不稀释
10%小白菜组织	不稀释	10%萝卜组织	不稀释

注: 稀释液为试剂一

## 实验关键点

- ① 试剂五工作液现用现配。
- ② 样本提取与离心过程保持 4°C 环境。

## 操作步骤

### 酶促反应

- ① 基质管：取 100  $\mu\text{L}$  超纯水，加入到 1.5 mL EP 管中；  
基质空白管：取 300  $\mu\text{L}$  超纯水，加入到 1.5 mL EP 管中；  
测定管：取 100  $\mu\text{L}$  待测样本，加入到 1.5 mL EP 管中；  
对照管：取 200  $\mu\text{L}$  超纯水、100  $\mu\text{L}$  待测样本，加入到 1.5 mL EP 管。
- ② 向步骤①中基质管、测定管加入 200  $\mu\text{L}$  试剂四工作液。
- ③ 向上述各管中加入 200  $\mu\text{L}$  试剂五工作液。
- ④ 轻柔混匀后，37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h，然后激烈震荡 30 s 后取上清，到酶标板中进行显色反应。

### 显色反应

- ① 标准孔：取 80  $\mu\text{L}$  不同浓度标准品，加入到酶标板上对应的标准孔中；  
从酶促反应的基质管、基质空白管、测定管、对照管中分别取 80  $\mu\text{L}$  上清液到酶标板上对应的基质孔、基质空白孔、测定孔、对照孔中。
- ② 向①中各孔加入 160  $\mu\text{L}$  的显色工作液。
- ③ 振板 10 s，静置 5 min，在酶标仪 540 nm 处测定各孔 OD 值。

## 操作表

### 酶促反应

	基质管	基质空白管	测定管	对照管
超纯水( $\mu\text{L}$ )	100	300	--	200
待测样本( $\mu\text{L}$ )	--	--	100	100
试剂四工作液( $\mu\text{L}$ )	200	--	200	--
试剂五工作液( $\mu\text{L}$ )	200	200	200	200
轻柔混匀, 37°C 孵育 1 h, 然后激烈震荡 30s 后取上清, 在酶标板中进行显色反应。				

### 显色反应

	基质孔	基质空白孔	测定孔	对照孔	标准孔
样本上清液( $\mu\text{L}$ )	80	80	80	80	--
不同浓度标准品( $\mu\text{L}$ )	--	--	--	--	80
显色工作液( $\mu\text{L}$ )	160	160	160	160	160
振板 10 s, 静置 5 min, 在酶标仪 540 nm 处测定各孔 OD 值。					

本试剂盒检测植物组织样本时, 可测定总蛋白浓度, 推荐使用本公司考马斯亮蓝法 (货号 E-BC-K168-M) 进行测定。

## 结果计算

标准品拟合曲线:  $y = ax + b$

组织样本(以组织湿重进行计算):

定义: 每小时每 g 鲜重样中催化还原  $1 \mu\text{mol NO}_2^-$  的量为一个亚硝酸还原酶(NiR)活力单位

$$\begin{aligned} \text{硝酸还原酶(NiR)活力} \\ (\mu\text{mol/h/g}) \end{aligned} = (\Delta A - b) \div a \times V_1 \div V_2 \times V_3 \div m \times f \div t$$

组织样本(以蛋白浓度进行计算):

定义: 每小时每 mg 蛋白样中催化还原  $1 \mu\text{mol NO}_2^-$  的量为一个亚硝酸还原酶(NiR)活力单位

$$\begin{aligned} \text{硝酸还原酶(NiR)活力} \\ (\mu\text{mol/h/mgprot}) \end{aligned} = (\Delta A - b) \div a \times V_1 \div V_2 \div C_{pr} \times f \div t$$

**注解:**

y: 标准品 OD 值-空白孔 OD 值 (标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x: 标准品的浓度

$\Delta A$ : (基质孔 OD 值-基质空白孔 OD 值) - (样本测定孔 OD 值-对照孔 OD 值)

a: 标曲斜率

b: 标曲截距

m: 组织湿重, g

V1: 取上清液前的反应体系体积, 0.5 mL

V2: 加入的样本体积, 0.1 mL

V3: 植物组织处理过程中加入试剂一的体积, mL

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

$C_{pr}$ : 待测样本蛋白浓度, mgprot/mL

t: 反应时间, 1 h

## 附录1 关键数据

### 1. 技术参数

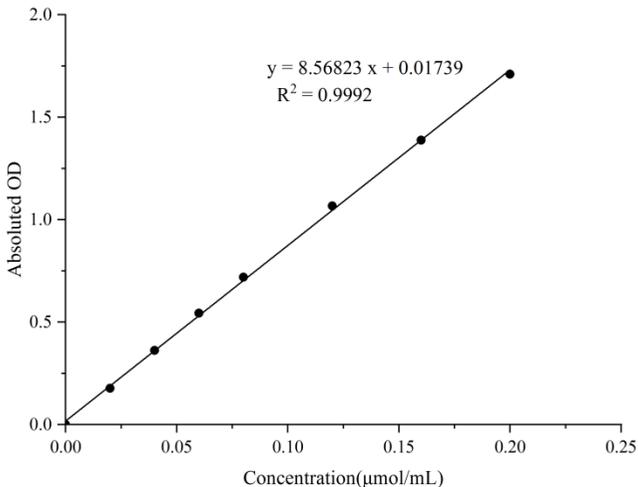
检测范围	0.045-9 $\mu\text{mol/h/g}$	批间差	3.5-7.7%
灵敏度	0.045 $\mu\text{mol/h/g}$	批内差	0.6-1.8%

### 2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量80  $\mu\text{L}$ ，按照操作步骤进行实验，测得各浓度标准品OD值如下表所示：

标准品浓度 ( $\mu\text{mol/mL}$ )	0	0.025	0.05	0.10	0.12	0.14	0.16	0.2
OD 值	0.039	0.213	0.399	0.586	0.755	1.107	1.426	1.766
	0.037	0.218	0.400	0.577	0.759	1.102	1.426	1.729
平均 OD 值	0.038	0.215	0.400	0.582	0.757	1.105	1.426	1.748
绝对 OD 值	0.000	0.177	0.362	0.544	0.719	1.067	1.388	1.710

②按上表数据绘制标准曲线，如下图所示：



## 附录2 实例分析

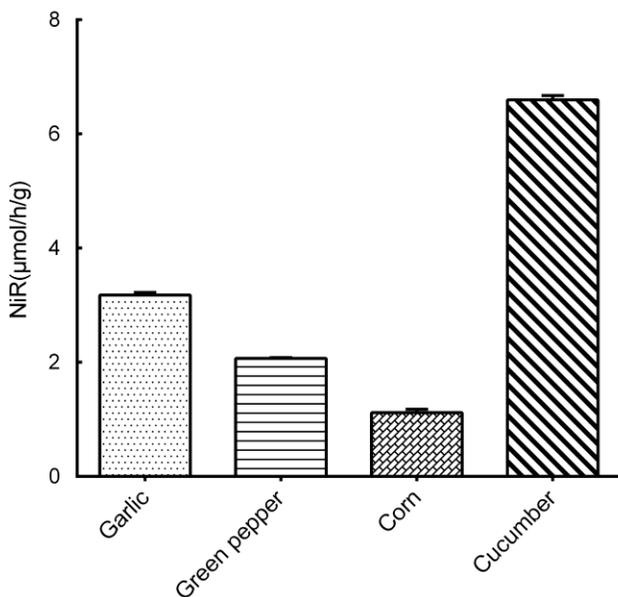
例如检测绿萝叶片组织(数据仅供参考):

取10%绿萝组织匀浆上清液100  $\mu\text{L}$ ，按操作表操作，结果如下:

标准曲线:  $y = 8.56823x + 0.01739$ ，基质管测定孔OD值为1.134，基质空白孔OD值为0.043，测定孔OD值为0.239，对照孔OD值为0.040， $\Delta A = (1.134 - 0.043) - (0.239 - 0.040) = 0.892$ ，计算结果为:

$$\text{亚硝酸还原酶(NiR)活力} (\mu\text{mol/h/g}) = (0.892 - 0.01739) \div 8.56823 \times 0.5 \div 0.1 \times 0.9 \div 0.1 \div 1 = 4.59 \mu\text{mol/h/g}$$

按照说明书操作，测定大蒜头（10%组织匀浆，加样量100  $\mu\text{L}$ ）、青椒（10%匀浆，加样量100  $\mu\text{L}$ ）、玉米果肉（10%组织匀浆，加样量100  $\mu\text{L}$ ）、黄瓜（10%组织匀浆，加样量100  $\mu\text{L}$ ）中亚硝酸还原酶活力（ $\mu\text{mol/h/g}$ ）（如下图）:



### 附录 3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数, 重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本, 重新检测
样本测量结果过大	样本浓度太高	选择合适稀释倍数, 重新检测

## 声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。