

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号：GBQ262

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

网址：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 NO_2^- 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_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 GBQ129) 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℃避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 A (Buffer A)	24 mL×1 瓶	2-8℃避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	缓冲液 B (Buffer B)	24 mL×1 瓶	2-8℃保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	底物 A (Substrate A)	粉剂×2 瓶	2-8℃避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent5)	底物 B (Substrate B)	粉剂×6 支	2-8℃避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent6)	显色剂 A (Chromogenic Agent A)	10 mL×1 瓶	2-8℃避光 保存 6 个月
试剂七 (Reagent7)	显色剂 B (Chromogenic Agent B)	10 mL×1 瓶	2-8℃避光 保存 6 个月
试剂八 (Reagent8)	标准品 (Standard)	粉剂×1 支	2-8℃避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	96 孔×1 块	无要求
	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℃。

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℃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 μL 的试剂八工作液，充分混匀，2-8℃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℃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(μL)	0	62.5	125	250	300	350	400	500
试剂一(μL)	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℃, 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℃环境。

操作步骤

酶促反应

- ① 基质管：取 100 μL 超纯水，加入到 1.5 mL EP 管中；
基质空白管：取 300 μL 超纯水，加入到 1.5 mL EP 管中；
测定管：取 100 μL 待测样本，加入到 1.5 mL EP 管中；
对照管：取 200 μL 超纯水、100 μL 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 μL 试剂四工作液。
- ③ 向上述各管中加入 200 μL 试剂五工作液。
- ④ 轻柔混匀后，37°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 μL 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 μL 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 μL 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(μL)	100	300	--	200
待测样本(μL)	--	--	100	100
试剂四工作液(μL)	200	--	200	--
试剂五工作液(μL)	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(μL)	80	80	80	80	--
不同浓度标准品(μL)	--	--	--	--	80
显色工作液(μL)	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 GBQ129) 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

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

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

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

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

ΔA : (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

V_1 : 取上清液前的反应体系体积, 0.5 mL

V_2 : 加入的样本体积, 0.1 mL

V_3 : 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

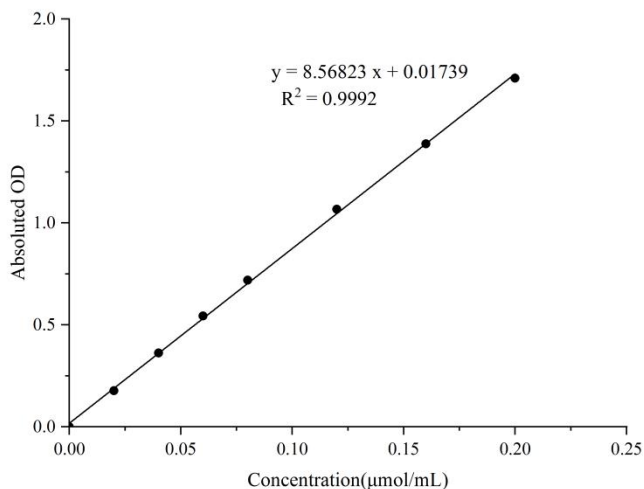
检测范围	0.045-9 $\mu\text{mol/h/g}$	批间差	3.5-7.7%
灵敏度	0.045 $\mu\text{mol/h/g}$	批内差	0.6-1.8%

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量80 μL ，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

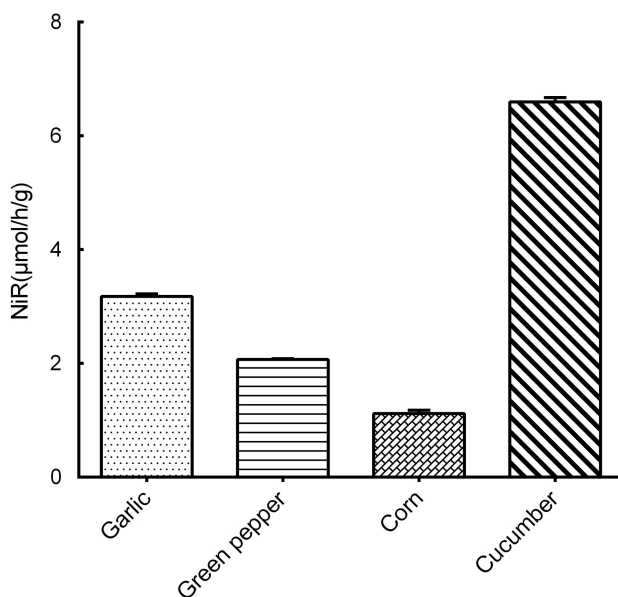
例如检测绿萝叶片组织(数据仅供参考):

取10%绿萝组织匀浆上清液100 μL ，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：

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

按照说明书操作，测定大蒜头（10%组织匀浆，加样量100 μL ）、青椒（10%匀浆，加样量100 μL ）、玉米果肉（10%组织匀浆，加样量100 μL ）、黄瓜（10%组织匀浆，加样量100 μL ）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。