天净沙系列

CAT#:EC1.18.6.1

低温运输，-20℃保存

固氮酶活性测定试剂盒

Nitrogenase Assay Kit

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品用于测定固氮酶（Nitrogenase，EC1.18.6.1，CAS: 9013-04-1）活性。其原理是连二亚硫酸钠会在固氮酶固氮过程中为其提供电子，连二亚硫酸钠在 315 nm 处有特征光吸收，故通过监测吸光度随时间的下降的量，即可间接计算酶活性。本产品具有如下特点：

1. 即开即用，使用便捷，用户不需要优化条件，只需准备待测样本。
2. 最低检测限为 0.18 U，线性范围在 0.25 U-0.71 U 之间。
3. 本试剂盒 1 个酶活性单位的定义是在 25℃ pH 7.0 的条件下，每分钟能催化 1 μmol 底物转化所需的酶量。由于 1 个氮气分子的固定将消耗 8 个电子，而一分子的连二亚硫酸钠能提供 2 分子的电子，故 1 个酶活性单位相当于在 25℃ pH 7.0 的条件下每分钟消耗 4 μmol 连二亚硫酸钠所需的酶量。
4. 本产品足够 100 次 1 mL 体系的比色皿检测或 400 次 250 μL 体系的 96 孔板检测。
5. 本产品只可用于科研。

规格及成分

本产品采用小扁盒包装

成份	编号	规格	包装
固氮酶活性测定反应液	EC1.18.6.1r	50 mL	60 mL 本色瓶
固氮酶活性测定底物干粉	EC1.18.6.1s	100 T	60 mL 本色瓶
使用手册	EC1.18.6.1sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期一年。

自备试剂

待测样品，超纯水，蛋白浓度测定试剂盒，比色皿及与之匹配的分光光度计，96 孔板及与之匹配的分光光度计。

使用方法

注：固氮酶检测需要在无氧环境下进行，故以下所有试剂配制及反应均需在抽真空后的氮气环境中进行。

一、首次使用本试剂盒时配制下列溶液

1. 配制固氮酶活性测定底物液：将 50 mL 固氮酶活性测定反应液加入到装有固氮酶活性测定底物干粉的瓶中，颠倒摇晃 20 次溶解，得固氮酶活性测定底物液。
2. 如果一次实验没有用完上述溶液，需要放-20℃或更低温度保存。

二、制备待测样本

3. 用自备试剂制备待测样品。注意：由于带有铵根离子和硝酸根离子的含氮化合物会严重抑制固氮酶活性，故样本中不得含有这些物质。同时，由于本试

剂盒测定的是连二亚硫酸钠，故样本中也不得有连二亚硫酸钠的成份。

4. 预留 10 mL 最后溶解样本的样本溶解液，作为后续测光吸收时的阴性对照。

5. 用自备试剂测定待测样本的蛋白浓度，以备后续计算比活时使用。

三、1 mL 体系 1 cm 光径比色皿测定

6. 根据所用分光光度计一次可以同时测定几个样本决定每次测定的样本数量。下面的操作以每次能测 4 个样本的分光光度计为例。标记 0-3 号共 4 个 1.5 mL 干净塑料离心管，然后按下表分别加入各成份：

成份	0 号管 阴性对照	1 号管 待测样 1	2 号管 待测样 2	3 号管 待测样 3
固氮酶活性测定底物液	0.98 mL	0.98 mL	0.98 mL	0.98 mL
涡旋振荡 30 秒混匀，迅速加入下列成份后开始计时				
自备样本溶解液	20 μL	不加	不加	不加
自备待测样本 1	不加	20 μL	不加	不加
自备待测样本 2	不加	不加	20 μL	不加
自备待测样本 3	不加	不加	不加	20 μL
总体积	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL

7. 涡旋振荡 10 秒混匀，将 4 个管中的混合液快速转移到 4 个比色皿中，在 1 分钟时（从加入样本时开始）第 1 次测定 315 nm 的光吸收，然后每分钟测定一次，共测定 6 次。

四、数据处理

8. 计算△A/min 测定值：以时间为横轴，以各样本不同时间点的 A 值为纵轴，绘制反应速率曲线，选择线性区域并计算△A/min，此为测定值。空白样本（0 号阴性对照管）也需要计算此值。

9. 计算△A/min 真实值：样本△A/min 测定值-空白样本△A/min 测定值=样本△A/min 真实值。N 个待测样本将有 N 个数据。

10. 将△A 换算成每分钟连二亚硫酸钠浓度降低：根据朗伯-比尔定律△A=εlc=消光系数*光径*浓度，则所测连二亚硫酸钠浓度降低=△A/（消光系数*光径）。代入连二亚硫酸钠在 315 nm 的消光系数 8000 L/cm*mol 和所用比色皿光径 1 cm，则连二亚硫酸钠浓度降低=△A/[(8000/cm*mol)*1cm]=（△A/8000) mol/L=（△A/8.0) μmol/mL。后面用 x 表示（△A/8.0）。

11. 将每分钟连二亚硫酸钠浓度μM 降低转换成每分钟μmol 的降低：酶反应体积为 1 mL，故每分钟连二亚硫酸钠降低的μmol 数=浓度*1 mL=（x μ

	mol/mL）*1 mL= x μmol。 12. 1个酶活性单位是在25℃ pH 7.0条件下每分钟催化4 μmol连二亚硫酸钠降低所需的酶量，故反应体系中的固氮酶单位数=0.25x U。 13. 计算样本中的酶浓度：由于加入到1 mL反应体系中的待测样本体积为0.02 mL（20 μL），故待测样本的酶浓度为0.25x U/0.02 mL=12.5x U/mL。 14. 计算样本的酶比活性：样本总体积乘以酶浓度 U/mL 即得样本总酶单位数U，样本总体积乘以其蛋白浓度即得样本总蛋白量（以 mg 为单位），样本酶比活（U/mg）=总酶单位数/总蛋白量。 **四、96孔板检测** 15. 操作同上，只是在设置反应时，各成份的用量降低75%，只用25%，计算时体积不是1 mL，而是0.25 mL。同时光径不是1 cm，要根据所用96孔板修改（需要咨询厂家）。消光系数不变。
关联产品	NAD (+)-固氮酶ADP-D-核糖基转移酶活性测定试剂盒