

硝酸还原酶（Nitrate Reductase, NR）活性测定试剂盒说明书

微量法 100管/48样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

NR（EC 1.7.1.3）广泛存在于植物中，是植物硝态氮转化为氨态氮的关键酶，也是诱导酶，对作物的产量和品质有影响。

测定原理：

NR催化硝酸盐还原为亚硝酸盐， $\text{NO}_3^- + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$ ；产生的亚硝酸盐能够在酸性条件下，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540 nm有最大吸收峰，可用分光光度法测定。

自备仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

诱导剂储备液：液体50mL×1瓶，4℃保存。

提取液：液体60mL×1瓶，4℃保存。

试剂一：液体10mL×1瓶，-20℃保存。

试剂二：液体5mL×1瓶，-20℃保存；

试剂三：液体6mL×1瓶，4℃保存（如出现结晶析出，60℃-90℃水浴溶解后使用）；

试剂四：液体6mL×1瓶，4℃保存。

试剂五：标准储备液1mL，-20℃保存。

诱导剂应用液的配制：用时将诱导剂储备液稀释10倍，即取10mL诱导剂储备液加90mL蒸馏水，充分混匀。

0.1 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 的标准液的配制：用时将试剂五稀释100倍，即取0.1ml试剂五加9.9mL蒸馏水，充分混匀。

样本前处理

动植物组织样品的前处理：

- （1）取适量诱导剂于烧杯中，将新鲜标本洗净，滤纸吸干，放入诱导剂应用液中（淹没即可），浸泡2h，取出样本，滤纸吸干。
- （2）按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液），进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

注意：

- 1、建议使用新鲜没有冷冻过的样本。
- 2、一般不要诱导处理，预测定结果没有活性（A测定 \leq A对照管）则需要诱导处理。

细菌或培养细胞的前处理：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议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，功率20%或200W，超声3s，间隔10s，重复30次）；8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

硝酸还原酶（Nitrate Reductase, NR）活性测定试剂盒说明书 测定步骤

1、分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至540nm，蒸馏水调零。

2、样本测定（在EP管或96孔板中加入下列试剂）

试剂名称（ μL ）	加样孔			
	测定管	对照管	标准管	空白管
样本	20	20		
0.1 $\mu\text{mol/mL}$ 标准液			20	
蒸馏水		75		95
试剂一	75		75	
试剂二	25	25	25	25

混匀后，37°C（哺乳动物）或25°C（其它物种）反应30min

试剂三	50	50	50	50
试剂四	50	50	50	50

混匀，25°C室温显色20min，540nm处比色

注意：1、标准管和空白管只需测一次，每个测定管设一个对照管。

2、诱导处理后的样本对照管中试剂二改成加25 μL 蒸馏水。

NR活性计算：

（1）按样本鲜重计算：

单位定义：每小时每g鲜重样品中催化产生 1 $\mu\text{mol NO}_2^-$ 的量为一个 NR活力单位。

$$\text{NR } (\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = (\text{C标准管} \times \text{V1}) \times (\text{A测定管} - \text{A对照管}) \div (\text{A标准管} - \text{A空白管}) \div (\text{W} \times \text{V1} \div \text{V2}) \div \text{T} = 0.2 \times (\text{A测定管} - \text{A对照管}) \div (\text{A标准管} - \text{A空白管}) \div \text{W}$$

（2）按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每小时每mg组织蛋白催化产生 1 $\mu\text{mol NO}_2^-$ 的量为一个 NR活力单位。

$$\text{NR } (\mu\text{mol/h/mg prot}) = (\text{C标准管} \times \text{V1}) \times (\text{A测定管} - \text{A对照管}) \div (\text{A标准管} - \text{A空白管}) \div (\text{V1} \times \text{Cpr}) \div \text{T} = 0.2 \times (\text{A测定管} - \text{A对照管}) \div (\text{A标准管} - \text{A空白管}) \div \text{Cpr}$$

C标准管：标准管浓度，0.1 $\mu\text{mol/mL}$ ；V1：加入样本体积；0.02mL；V2：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，0.5h；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本鲜重，g。

