硝酸还原酶 (NR) 活性检测试剂盒说明书

微量法

规格：100 T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致。

试剂名称	规格	保存条件
诱导剂储备液	液体100 mL×1瓶	2-8℃保存
提取液	液体120mL×1瓶	2-8℃保存
试剂一	液体15mL×1瓶	-20℃保存
试剂二	粉剂×1瓶	-20℃保存

溶液的配制：

1、 诱导剂储备液：用蒸馏水10倍稀释后使用，即取10mL 诱导剂储备液加90mL 蒸馏水，充分混匀。现配现用。

2、 试剂二：临用前加入2mL 提取液溶解，可分装后-20℃保存，避免反复冻融。 -20℃保存2周。

产品说明：

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。

NR 催化硝酸盐还原为亚硝酸盐， NADH 在340nm 下有特征吸收峰，340nm 下吸光值的变化即可表示酶活。

$$NO_3^- + NADH\ (340nm) + H^+ \xrightarrow{\text{Nitrate Reductase}} NO_2^- + NAD^+ + H_2O$$

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。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、微量石英比色皿/96孔UV 板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一 、样本处理(可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献)

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)避光，浸泡2h，取出样本，滤纸吸干后， -20℃冷冻30min, 取出样本，滤纸吸干。(一般不需要诱导处理，预实验结果没有活性则需要进行诱导处理)

2、称取约0.1g 样本，加入1mL 提取液，冰浴研磨，4000g,4℃ 离心10min, 取上清置冰上待测。

二 、测定步骤

1、分光光度计/酶标仪预热30min 以上，调节波长至340nm, 蒸馏水调零。

2、样本测定(在EP管中加入下列试剂)

试剂名称(μL)	测定管	空白管
样本	12	

提取液	68	80
试剂一	108	108
试剂二	12	12

充分混匀后测定340nm 下的初始值A1,25℃ （其他物种）或37℃（哺乳动物）反应30min 后再次测定吸光值A2, 计算△A 测定管=A1 测定管-A2 测定管，△A 空白管= A1 空白管-A2 空白管，△A=△A 测定管-△A 空白管。（空白管只需测1-2次）

三、NR 活性计算

1、按微量石英比色皿计算：

（1）按样本质量计算：

酶活单位定义：每小时每 g 样本中消耗1 μmol NADH的量为一个 NR 活力单位。

NR 活性 (U/g 质量)=[△A×V反总÷(ε×d)×10^6]÷(W÷V提取×V 样)÷T=5.359×△A÷W

（2）按样本蛋白浓度计算：

酶活单位定义：每小时每mg 组织蛋白消耗1 μmol NADH 的量为一个 NR 活力单位。

NR 活性 (U/mg prot)=[△A×V 反总÷(ε×d)×106]÷(V 样×Cpr)÷T=5.359×△A÷Cpr

V 反总：反应体系体积，2×10+L;V 样：吸取样本体积，0.012mL;V 提取：加入提取液体积，1mL;T: 反应时间，0.5h;ε:NADH 的摩尔消光系数，6220L/mol/cm;d: 微量石英比色皿光径，1cm;Cpr: 样本蛋白质浓度，mg/mL;W: 样本质量，g;10^6: 单位换算系数，1mol=10^6μmol。

2、按 9 6 孔UV 板计算：

将上述公式中的d-1cm 换为d-0.6cm(96 孔UV 板光径)进行计算即可。

注意事项：

1、 当测定的吸光值大于1.5或者△A 大于0.5时，建议将上清液稀释后测定。

2、△A 测定过小(小于0.01),可延长酶促反应时间。

3、 建议一次测定不要测定过多样本以免耽误过多的酶促反应时间。

4、 空白管为检测各试剂组分质量的检测孔，正常情况下，变化不超过0.05。

实验实例：

1、取0. 1g 小叶黄杨加入1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清后再用提取液稀释2倍，之后按照测定步骤操作，用微量石英比色皿测得计算△A 测定管=A1 测定管-A2 测定管=1.4285-1.1089=0.3196,△A 空白管=A1空白管-A2 空白管=0.8794-0.8334=0.046,△A=△A 测定管-△A空白管=0.3196-0.046=0.2736,按样本质量计算酶活得：

NR 活性 (U/g 质量)=5.359×△A÷W×2 (稀释倍数)=5.359×0.2736÷0.1×2=29.3244U/g 质量。

2、 取0.1g 玉兰加入1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清后再用提取液稀释2倍，之后按照测定步骤操作，用微量石英比色皿测得计算△A 测定管=A1测定管-A2 测定管=1.4696-1.0602=0.4094,△A 空白管=A1空白管-A2 空白管=0.8794-0.8334=0.046,△A=△A测定管-△A 空白管=0.4094-0.046=0.3634,按样本质量计算酶活得：

NR 活性 (U/g 质量)=5.359×△A÷W×2(稀释倍数)=5.359×0.3634÷0.1×2=38.9492U/g 质量。