

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

注 意：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。

需自备的仪器和用品：

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。

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（ μ L）	加样孔			
	测定管	对照管	标准管	空白管
样本	20	20		
0.1 μ 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℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）反应 30min

试剂三	50	50	50	50
试剂四	50	50	50	50

混匀，25℃ 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 μ L 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 μ mol NO₂⁻ 的量为一个 NR 活力单位。

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

(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 μ mol NO₂⁻ 的量为一个 NR 活力单位。

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

C 标准管：标准管浓度，0.1 μ 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。