

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

（分光法 48 样）

一、产品简介：

硝酸还原酶（NR，EC 1.7.1.3）广泛存在于植物中，是一种诱导酶。是植物硝态氮转化为氨态氮的关键酶，与作物有效吸收和利用氮素肥料有关，是植物营养或农田施肥的指标之一，也可作为品种选育的指标之一。

本试剂盒采用离体法检测，通过硝酸还原酶催化硝酸盐还原为亚硝酸盐，亚硝酸盐进一步与磺胺及 α -萘胺定量生成紫红色偶氮化合物；颜色深浅与硝酸还原酶活性呈正比，通过检测该物质于 530nm 的吸光值，即可得出硝酸还原酶的活性。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 70mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×1 瓶	4℃保存	用前甩几下使试剂落入试管底部，再加 18mL 提取液溶解，仍 4℃保存。
试剂二	粉剂 mg×4 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部，每支分别加 1.8mL 蒸馏水溶解，用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融，三天内用完。
试剂三	粉剂 mg×2 瓶	4℃保存	用前甩几下使试剂落入底部，每瓶分别加 12mL 蒸馏水，于 70℃水浴约半小时至完全溶解备用。
试剂四	液体 22mL×1 瓶	4℃保存	使用前需超声至完全溶解。
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、可调式移液器、水浴锅/恒温培养箱、台式离心机、研钵、冰和蒸馏水。

四、硝酸还原酶（NR）活性测定：

由于硝酸还原酶是个诱导酶，酶活性大小与取样前是否诱导有关（施过氮肥、光照充足条件下所取植物样本即为诱导处理样本），因此务必取 2 个样本做预测定，依据预测定结果选择是否进行诱导处理。

酶的诱导（选做）：取适量新鲜样本洗净，放入盛有 1mg/mL 硝酸钾溶液（自备）的烧杯中（淹没即可），浸泡 2h，取出样本用滤纸吸干后，-20℃冷冻 30min，取出样本再用滤纸吸干后即可按照样本制备步骤制备待测上清液。

1、样本制备：

① 组织样本：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆（难磨样本可用石英砂研磨，不能用液氮研磨）。12000rpm，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

【注意】提取过程操作应迅速，并且在 4℃下进行。若样本颜色较深（如植物叶片），可在样本制备过程中增加除色素步骤：取约 0.2g 组织（水分充足的样本可取 1g），加入 1mL 的 80%乙醇冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，弃掉色素较深的上清液；以上除色素步骤重复 2 次。最后向离心得到的沉淀中加入 1mL 提取液，混匀或再次冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 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，300W，超声 3s，间隔 7s，总时间 3min）；12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、上机检测：

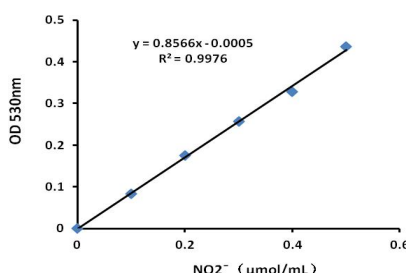
- ① 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 530nm，蒸馏水调零。
- ② 反应 **mix** 的制备：已完全溶解的试剂三和试剂四按照 1:1 的比例混合（每次可根据检测样本数量现用现配），试剂三和四完全溶解后于 4℃ 存放一段时间会有沉淀析出，每次配置反应 **mix** 前需重新完全溶解。
- ③ 在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	80	80
试剂一	280	
试剂二	120	
蒸馏水		400
30℃（如水浴锅或恒温培养箱）避光培养 30min		
反应 mix	400	400
混匀，30℃避光反应 15min，全部澄清液体转移至 1mL 玻璃比色皿中，立即于 530nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本需做一个自身对照）。		

- 【注】：1. 若 ΔA 值低于 0.005，可增加样本加样体积 V1（如增至 150μL，则试剂一相应减少），则改变后的 V1 需代入公式重新计算。
2. 若整个反应结束后有沉淀浑浊现象，加完反应 **mix** 于 30℃避光反应 15min 后，室温 12000rpm 离心 3min，取全部上清液至 1mL 玻璃比色皿中读值。

五、结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 0.8566x - 0.0005$ ；x 为标准品摩尔质量 (μmol/mL)，y 为 ΔA 。



- 2、按样本鲜重计算：

单位定义：每小时每克鲜重样品中催化产生 1nmol NO₂⁻ 的量为一个 NR 活力单位。

$$\text{NR}(\text{nmol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0005) \div 0.8566 \times 10^3 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \div T = 2335 \times (\Delta A + 0.0005) \div W$$

- 3、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每小时每毫克组织蛋白催化产生 1nmol NO₂⁻ 的量为一个 NR 活力单位。

$$\text{NR}(\text{nmol/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0005) \div 0.8566 \times 10^3 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 2335 \times (\Delta A + 0.0005) \div \text{Cpr}$$

- 4、按细菌或细胞密度计算：

单位定义：每小时每百万细菌或细胞催化产生 1nmol NO₂⁻ 的量为一个 NR 活力单位。

$$\text{NR}(\text{nmol/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0005) \div 0.8566 \times 10^3 \times V1] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 4.67 \times (\Delta A + 0.0005)$$

V---加入提取液体积，1mL； V1---加入样本体积：0.08mL； T---反应时间，30min=0.5h；

W---样本鲜重，g； 500---细胞数量，百万； 标准品亚硝酸钠的分子量---69；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液：标准品用 1mL 的蒸馏水溶解，再用蒸馏水稀释 200 倍即为 0.5μmol/mL，现配现用。（母液需在两天内用且-20℃保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5μmol/mL。也可根据实际来调整标准品浓度。
- 3 按照测定管的加样步骤操作，根据结果即可制作标准曲线。