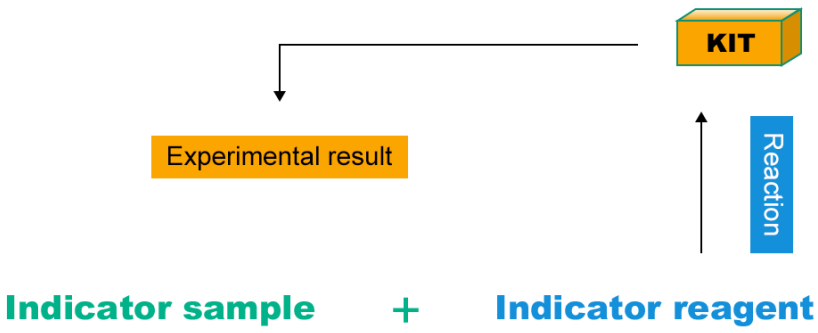
上海茁彩生物科技有限公司

ZCIBIO Technology Co.,Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO：ZC-S0370 Size：100T/96S

硝酸还原酶(NR)检测试剂盒说明书

微量法

***正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定**

一、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。

二、测定原理：

NR 催化硝酸盐还原为亚硝酸盐，NO^{3-} +NADH+H^{+} → NO^{2-} +NAD^{+} +H_2O，NADH在340nm下有特征吸收峰，340nm下吸光值的变化即可表示酶活。

三、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 孔板（ZC-1036：UV板）、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
诱导剂储备液	液体 100mL×1瓶	4℃保存	
提取液	液体 120mL×1瓶	4℃保存	
试剂一	液体 15mL×1瓶	-20℃保存	
试剂二	粉剂×1瓶	-20℃保存	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。

五、操作步骤：

●样品测定的前处理

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）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。（根据需要进行诱导处理）

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。

●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 A1，37℃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。注意：空白管只需测 1-2 次。

六、NR 活性计算：

●按微量石英比色皿计算：按样本鲜重计算：

酶活单位定义：每小时每 g 鲜重样品中消耗 1μmolNADH 的量为一个 NR 活力单位。

NR（U/g 鲜重）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^6]÷(W÷V 提取×V 样)÷T=5.359×ΔA÷W。

（1）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 1μmol NADH 的量为一个 NR 活力单位。

NR（U/mg prot）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^6]÷(V 样×Cpr) ÷T=5.359×ΔA÷Cpr。

V 总：反应体系体积，2×10^{-4}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：6220 L/mol/cm；d：比色皿光径:1cm;Cpr： 样本蛋白质浓度,mg/mL;W:样本鲜重,g;10^6:单位换算系数,1mol=10^6nmol。

●按 96 孔 UV 板计算：

将上述公式中的 d=1cm 换为 d=0.6cm（比色皿光径）进行计算即可

七、注意事项：

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

2.ΔA 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品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