

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-S0643

Size: 50T/48S

## 硝酸还原酶(NR)检测试剂盒说明书

### 紫外分光光度法

\*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,  $\text{NO}_3^- + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$ , 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、水浴锅、台式离心机、1mL 石英比色皿、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 50mL × 1 瓶	4°C 保存	10 倍稀释后使用, 现配现用。
提取液	液体 80mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 30mL × 1 瓶	-20°C 保存	
试剂二	粉剂 × 1 瓶	-20°C 保存	临用前加入 5mL 提取液溶解, 可分装后 -20°C 保存, 避免反复冻融。-20°C 可保存 2 周。

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

## 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， $-20^{\circ}\text{C}$  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， $4^{\circ}\text{C}$  离心 10min，取上清置冰上待测。

### ● 测定步骤

1. 分光光度计预热 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 ( $\mu\text{L}$ )	测定管	空白管
样本	60	-
提取液	340	400
试剂一	540	540
试剂二	60	60

充分混匀后测定 340nm 下的初始值 A1， $25^{\circ}\text{C}$ （其他物种）或  $37^{\circ}\text{C}$ （哺乳动物）反应 30min 后再次测定吸光值 A2，计算  $\Delta A_{\text{测定管}} = A1_{\text{测定管}} - A2_{\text{测定管}}$ ， $\Delta A_{\text{空白管}} = A1_{\text{空白管}} - A2_{\text{空白管}}$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}$ 。

注意：空白管只需测 1-2 次。

## 六、NR 活性计算：

### (1) 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 1 $\mu$ mol NADH 的量为一个 NR 活力单位。

$$\text{NR (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 5.359 \times \Delta A \div W。$$

### (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 $\mu$ mol NADH 的量为一个 NR 活力单位。

$$\text{NR (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 5.359 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

V 反总：反应体系体积，0.001L；V 样：吸取样本体积，0.06mL；V 提取：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，0.5h； $\epsilon$ ：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<sup>6</sup> $\mu$ mol。

## 七、注意事项

1. 当测定的吸光值大于 1.5 或者  $\Delta A$  大于 0.6 时，建议将上清液稀释后测定。
2.  $\Delta A$  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，空白管的初始测定值（A1 空白管）在 0.9 左右，变化不超过 0.05。