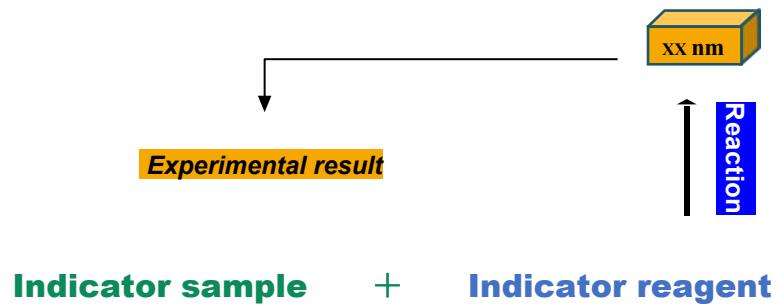


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

硝酸还原酶(NR)检测试剂盒说明书

微量法

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

产品内容：

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。

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， $\text{NO}_3^- + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$ ，NADH 在 340nm 下有特征吸收峰，340nm 下吸光值的变化即可表示酶活。

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。

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, 37°C 反应 30min 后再次测定吸光值 A2, 计算 ΔA 测定管 = A1 测定管 - A2 测定管, ΔA 空白管 = A1 空白管 - A2 空白管, $\Delta A = \Delta A$ 测定管 - ΔA 空白管。注意: 空白管只需测 1-2 次。

三、NR 活性计算:

(1) 1、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 1μmol NADH 的量为一个 NR 活力单位。

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

(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 1μmol NADH 的量为一个 NR 活力单位。

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

V 反总: 反应体系体积, $2 \times 10^{-4} \text{L}$; 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, $1 \text{mol} = 10^6 \text{nmol}$ 。

2、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

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