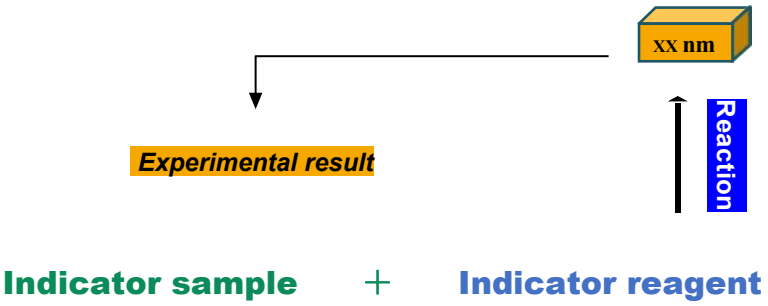
上海茁彩生物科技有限公司

Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.




生化检测原理示意图

货号：ZC-S0643 规格：50管/48样

# 硝酸还原酶(NR)检测试剂盒说明书
## 紫外分光光度法

**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。**

试剂的组成和配制：

| 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℃保存 | 10 倍稀释后使用，现配现用。 |
| 提取液 | 液体 80mL×1 瓶 | 4℃保存 | - |
| 试剂一 | 液体 30mL×1 瓶 | -20℃保存 | - |
| 试剂二 | 粉剂×1 瓶 | -20℃保存 | 临用前加入 5mL 提取液溶解，可分装后-20℃保存，避免反复冻融。-20℃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。 | | | |

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，$NO^{3-}+NADH+H^{+}\rightarrow NO^{2-}+NAD^{+}+H_2O$，NADH 在 340nm 下有特征吸收峰，340nm 下吸光值的变化即可表示酶活。

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。

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 | 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℃（其他物种）或 37℃（哺乳动物）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，ΔA=ΔA 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）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 鲜重）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×$10^6$]÷(W÷V 提取×V 样) ÷T=5.359×ΔA÷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 prot）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×$10^6$]÷(V 样×Cpr) ÷T=5.359×ΔA÷Cpr。

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；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=$10^6$μmol。

注意事项

1、 当测定的吸光值大于 1.5 或者ΔA 大于 0.6 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，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。