

## Nitrate Reductase Activity Assay Kit

### 硝酸还原酶(NR)活性检测试剂盒

产品编号	产品名称	规格
BL873B	硝酸还原酶(NR)活性检测试剂盒	48T

#### 产品简介:

硝酸还原酶 (Nitrate Reductase, 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。氮素吸收的多少对作物的产量和品质有影响, 因而可作为植物营养或农田施肥以及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 $\alpha$ -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。

#### 产品组成:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	粉末×1 瓶	4°C 保存	使用前甩几下使试剂落入试管底部, 再加 5mL 提取液溶解, 仍 4°C 保存。
试剂二	粉末×2 支	-20°C 保存	使用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 每支分别加 1mL 蒸馏水溶解, 用不完的试剂分装后 -20°C 保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂三	粉末×1 瓶	4°C 保存	使用前甩几下使试剂落入底部, 加 6mL 蒸馏水, 于 70°C 水浴约半小时至完全溶解备用。
试剂四	液体 5mL×1 瓶	4°C 保存	使用前需超声至完全溶解。
标准品	粉末×1 支	4°C 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

#### 使用方法:

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。

##### 一、样本准备:

###### 1. 组织样本:

(a) 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);

(b) 10000-12000g, 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

**【注】:** 提取过程操作应迅速, 并且在 4°C 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, 10000-12000g, 4°C 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, 10000-12000g, 4°C 离心 10min, 取上清置冰上待测。

###### 2. 细菌/细胞样本:

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.

注意: 在体外研究使用, 不用于诊断或治疗用途, 本产品不是医疗装置。



- 收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；
- 取约  $5 \times 10^6$  个细菌或细胞加入加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；
- 10000-12000g，4°C 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按每  $0.5 \sim 1 \times 10^7$  个细菌/细胞数量加入 1mL 提取液的比例进行提取。

## 二、样品测定：

- 酶标仪预热 30min，设定波长到 530nm。
- 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°C 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。
- 在离心管中依次加入：

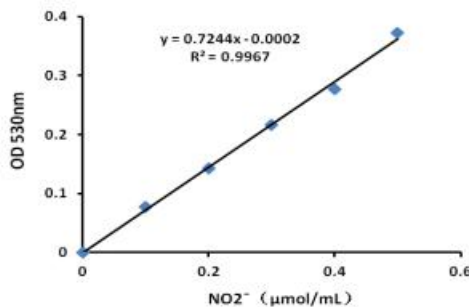
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	70	
试剂二	30	
蒸馏水		100
30°C（如水浴锅或恒温培养箱）避光培养 30min		
反应 mix	100	100
混匀，30°C 避光反应 15min，立即于 530nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本需做一个自身对照）。		

【注】：1. 若  $\Delta A$  值低于 0.005，可增加样本加样体积 V1（如增至 50μL，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，2. 可在 EP 管中重新按照上表加入相应试剂量，加完反应 mix 于 30°C 避光反应 15min 后，室温 10000-12000g 离心 3min，取等体积的上清液至 96 孔板中读值。

## 三、结果计算

- 标准曲线方程： $y = 0.7244x - 0.0002$ ；x 为标准品摩尔浓度 (μmol/mL)，y 为  $\Delta A$ 。



- 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 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 的量为一个 NR 活力单位。

$$\text{NR}(\text{nmol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0002) \div 0.7244 \times 10^3 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ = 2761 \times (\Delta A + 0.0002) \div W$$

- 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 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 的量为一个 NR 活力单位。

$$\text{NR}(\text{nmol/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0002) \div 0.7244 \times 10^3 \times V1] \div (V1 \times Cpr) \div T \\ = 2761 \times (\Delta A + 0.0002) \div Cpr$$

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.  
注意：在体外研究使用，不用于诊断或治疗用途，本产品不是医疗装置。



#### 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 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 的量为一个 NR 活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NR}(\text{nmol/h}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0002) \div 0.7244 \times 10^3 \times V1] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 5.52 \times (\Delta A + 0.0002) \end{aligned}$$

V---加入提取液体积, 1 mL

V1---加入样本体积: 0.02mL

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

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 0.5 $\mu$ mol/mL, 现配现用。(母液需在两天内用且-20 $^{\circ}$ C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, 0.5 $\mu$ mol/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。

#### 注意事项:

- 1、因提取液中含有蛋白质沉淀剂, 因此上清液不能用于蛋白质浓度测定。如需测定蛋白质浓度, 需另取组织测定。
- 2、本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品。
- 3、为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

#### 有效期:

-20 $^{\circ}$ C保存三个月。

