

硝酸还原酶（Nitrate Reductase, NR）活性测定试剂盒说明书

（货号：BP10355W-96 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

硝酸还原酶（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，是植物营养或农田施肥的指标之一，也可作为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 α -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成正比，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。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 1 瓶	4℃避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 10mL 提取液溶解，仍 4℃保存。
试剂二	粉剂 4 支	-20℃保存	每支： 1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 每支分别加 1mL 蒸馏水溶解，用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融，三天内用完。
试剂三	粉剂 2 瓶	4℃避光保存	每瓶： 1. 开盖前注意使粉剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 每瓶再加 6mL 蒸馏水，于 70℃水浴约半小时至完全溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	液体 12mL×1 瓶	4℃避光保存	1. 使用前需超声至完全溶解； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉剂 1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

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，依据测定结果选择是否进行诱导处理。

酶的诱导（选做）：取适量新鲜样本洗净，放入盛有 1mg/mL 硝酸钾溶液（自备）的烧杯中（淹没即可），浸泡 2h，取出样本用滤纸吸干后，-20℃冷冻 30min，取出样本

再用滤纸吸干后即可按照样本提取步骤制备待测上清液。

1、样本提取：

- ① 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)。12000rpm，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

【注意】提取过程操作应迅速，并且在 4℃下进行。若样本颜色较深（如植物叶片），可在样本提取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，12000rpm，4℃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，12000rpm，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

- ② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液；超声波破碎细菌或细胞（冰浴，300W，超声 3s，间隔 7s，总时间 3min）；12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 530nm。
② 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℃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。
③ 在 96 孔板中依次加入：

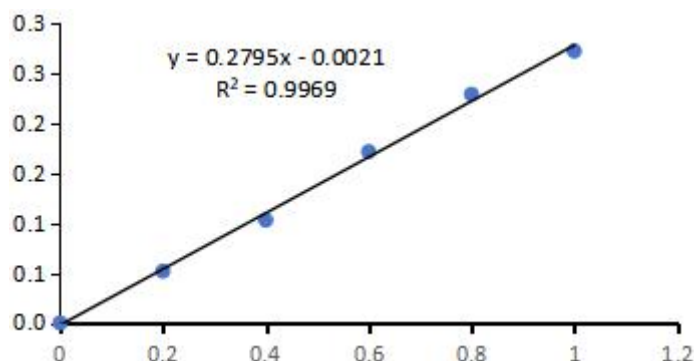
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	70	
试剂二	30	
蒸馏水		100
30℃（如水浴锅或恒温培养箱）避光培养 30min		
反应 mix	100	100
混匀，30℃避光反应 15min，立即于 530nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本需做一个自身对照）。		

【注】：1.若 ΔA 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），或延长反应时间 T（如由 30min 增至 60min），也可同时增加 V1 和延长反应时间 T，则改变后的 V1 和 T 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，可在 EP 管中重新按照上表加样，加完反应 mix 于 30℃避光反应 15min 后，室温 12000rpm 离心 3min，取等体积上清液至 96 孔板中读值。

五、结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 0.2795x - 0.0021$ ；x 为标准品摩尔浓度（μmol/mL），y 为 ΔA 。



2、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 NO₂⁻ 的量为一个 NR 活力单位。

$$NR(nmol/h/g \text{ 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0021) \div 0.2795 \times 10^3 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \div T = 7155.6 \times (\Delta A + 0.0021) \div W$$

3、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 NO₂⁻ 的量为一个 NR 活力单位。

$$NR(nmol/h/mg \text{ prot}) = [(\Delta A + 0.0021) \div 0.2795 \times 10^3 \times V1] \div (V1 \times Cpr) \div T = 7155.6 \times (\Delta A + 0.0021) \div Cpr$$

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 NO₂⁻ 的量为一个 NR 活力单位。

$$NR(nmol/h/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0021) \div 0.2795 \times 10^3 \times V1] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 14.3 \times (\Delta A + 0.0021)$$

V---加入提取液体积，1mL； 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； 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 标准品用 1mL 的蒸馏水溶解，再用蒸馏水稀释 100 倍即为 1μmol/mL，现配现用。（母液需在两天内用且-20℃保存）。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1μmol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下：

标品浓度 μmol/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	20	
蒸馏水		120
试剂一	70	
试剂二	30	

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， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{浓度管}}$		