

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 |
|--------|------------------|-----|
| BL873A | 硝酸还原酶(NR)活性检测试剂盒 | 24T |

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 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 40mL×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 9mL 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 1.8mL 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 12mL 蒸馏水, 于 70°C 水浴约半小时至完全溶解备用。 |
| 试剂四 | 液体 11mL×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:

- 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);
- 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。



- (a) 收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；
- (b) 取约 5×10^6 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）；
- (c) 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：

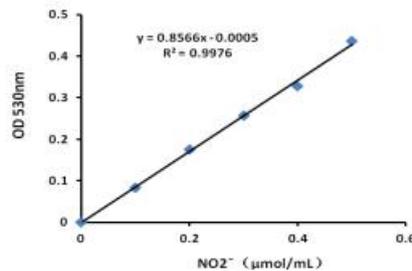
1. 可见分光光度计预热 30min，设定波长到 530nm，蒸馏水调零。
2. 反应 mix 的制备：已完全溶解的试剂三和试剂四按照 1:1 的比例混合（每次可根据检测样本数量现用现配），试剂三和四完全溶解后于 4°C 存放一段时间会有沉淀析出，每次配置反应 mix 前需重新完全溶解。
3. 在离心管中依次加入：

| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 对照管 |
|--|-----|-----|
| 样本 | 80 | 80 |
| 试剂一 | 280 | - |
| 试剂二 | 120 | - |
| 蒸馏水 | - | 400 |
| 30°C（如水浴锅或恒温培养箱）避光培养 30min | | |
| 反应 mix | 400 | 400 |
| 混匀，30°C 避光反应 15min，全部澄清液体转移至 1mL 玻璃比色皿中，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 150μL，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，加完反应 mix 于 30°C 避光反应 15min 后，室温 10000-12000g 离心 3min，取全部上清液至 1mL 玻璃比色皿中读值。

三、结果计算

1. 标准曲线： $y = 0.8566x - 0.0005$ ；x 为标准品摩尔质量 (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。

$$\begin{aligned} \text{NR}(\text{nmol/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0005) \div 0.8566 \times 10^3 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 2335 \times (\Delta A + 0.0005) \div W \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{NR}(\text{nmol/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0005) \div 0.8566 \times 10^3 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 2335 \times (\Delta A + 0.0005) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

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 NO₂⁻ 的量为一个 NR 活力单位。

$$\text{NR}(\text{nmol/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0005) \div 0.8566 \times 10^3 \times V1] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ = 4.67 \times (\Delta A + 0.0005)$$

V---加入提取液体积, 1 mL

V1---加入样本体积: 0.08mL

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 μ 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 μ 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。

