

硝酸还原酶（NR）活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1426

产品规格：100管/96样

产品简介：

NR（EC1.7.1.3）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。

注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
诱导剂储备液	液体100mL×1瓶	4℃
提取液	液体120mL×1瓶	4℃
试剂一	液体15mL×1瓶	-20℃
试剂二	粉剂×1瓶	-20℃

溶液的配制：

1. 诱导剂储备液：用蒸馏水10倍稀释后使用，即取10mL诱导剂储备液加90mL蒸馏水，充分混匀。现配现用。
2. 试剂二：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。

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、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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A1，25℃（其他物种）或37℃（哺乳动物）反应30min后再次测定吸光值A2，计算 $\Delta A_{\text{测定管}} = A1_{\text{测定管}} - A2_{\text{测定管}}$ ， $\Delta A_{\text{空白管}} = A1_{\text{空白管}} - A2_{\text{空白管}}$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}$ 。（空白管只需测1-2次）

三、NR活性计算

1. 按微量石英比色皿计算：



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

(1) 按样本质量计算:

酶活单位定义: 每小时每g样本中消耗1 μ mol NADH的量为一个NR活力单位。

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

(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1 μ mol NADH的量为一个NR活力单位。

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

V反总: 反应体系体积, 2×10^{-4} 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, 6220L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 10^6 : 单位换算系数, $1\text{mol} = 10^6\mu\text{mol}$ 。

2. 按96孔UV板计算:

将上述公式中的d-1cm换为d-0.6cm(96孔板光径)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本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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com