

硝酸还原酶（NR）活性检测试剂盒（Griess显色法） （可见分光光度法）

产品货号：BA1873

产品规格：50管/24样

产品简介：

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， $\text{NO}_3^- + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$ 。在酸性条件下，产生的 NO_2^- 能够参与重氮化反应生成紫红色化合物，这种紫红色化合物在540nm处有吸收峰，540nm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50mL×1瓶	2-8℃
提取液	液体30mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体12mL×1瓶	-20℃
试剂二	粉剂×2支	-20℃
试剂三	液体15mL×1瓶	2-8℃
试剂四	液体15mL×1瓶	2-8℃
标准品	液体1mL×1支	2-8℃

溶液的配制：

1. 诱导液：将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：加入1mL蒸馏水，-20℃分装保存，可以-20℃保存2周。临用前用蒸馏水将试剂二稀释50倍，备用，即取10μL试剂二加入490μL蒸馏水混匀。
3. 标准品：10μmol/mL亚硝酸钠标准溶液。临用前将用蒸馏水标准溶液稀释100倍得到0.1μmol/mL的亚硝酸钠标准液，备用。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、水浴锅/培养箱、台式离心机、1mL玻璃比色皿、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，具体比例可参考文献）

1. 组织前处理：

（1）取适量诱导液于烧杯中，将新鲜标本洗净，滤纸吸干，放入诱导液中（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，一般不需要诱导处理，预实验结果没有活性则需要诱导处理）。

（2）按照组织质量(g)：提取液体积(mL)为1:5~10的比例(称取约0.1g样本，加入1mL提取液)，冰浴研磨，8000g，4℃离心10min，取上清置冰上待测。



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

2. 细胞或细菌的前处理：先收集细胞或细菌样本到离心管内，弃上清，按照每500万细胞或细菌加入1mL提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率200W，超声3s，间隔10s，重复30次）。8000g，4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

二、测定步骤

1. 可见分光光度计预热30min以上，调节波长至540nm，蒸馏水调零。
2. 样本测定：

试剂名称（ μL ）	测定管	对照管	标准管	空白管
样本	100	100	-	-
0.1 $\mu\text{mol/mL}$ 标准溶液	-	-	100	-
蒸馏水	-	375	-	475
试剂一	375	-	375	200
试剂二	125	125	125	125
混匀，37℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）反应30min				
试剂三	250	250	250	250
试剂四	250	250	250	250
混匀，室温显色20min后测定540nm下的吸光度，分别记为A测定、A对照、A标准、A空白。				

三、NR 活性计算

（1）按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每小时每 mg 组织蛋白催化产生 1 μmol NO_2^- 的量为 1 个 NR 活力单位。

$$\text{NR 活力 (U/mg prot)} = \frac{C_{\text{标准}} \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times F}{= 0.2 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}} \times F}$$

（2）按样本质量计算：

酶活定义：每小时每 mg 组织催化产生 1 μmol NO_2^- 的量为 1 个 NR 活力单位。

$$\text{NR 活力 (U/g 质量)} = \frac{C_{\text{标准}} \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times V_{\text{样本}} \div (W \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}}) \div T \times F}{= 0.2 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times F}$$

（3）按细胞数量计算：

酶活定义：每小时每 1 万个细胞或细菌催化产生 1 μmol NO_2^- 的量为 1 个 NR 活力单位。

$$\text{NR 活力 (U/10}^4\text{cell)} = \frac{C_{\text{标准}} \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times V_{\text{样本}} \div (\text{细胞或细菌数量} \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}}) \div T \times F}{= 0.2 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div \text{细胞或细菌数量} \times F}$$

C 标准：亚硝酸钠标准溶液浓度，0.1 $\mu\text{mol/mL}$ ；V 提取：加入提取液体积，1mL；W：样本质量，g；T：反应时间，0.5h；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；V 样本：加入的样本体积，0.1mL；细胞或细菌数量：以万计；F：样本稀释倍数。

注意事项：

1. 吸光度大于 0.8 时，建议用提取液稀释样本，注意计算公式中参与计算的稀释倍数要相应改变。
2. 严格按照样本测定表格列出顺序加入试剂进行实验。

实验实例：

1. 取 0.1g 绿萝叶片加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，离心取上清按照测定步骤操作，测得 A 测定=0.072、A 对照=0.051、A 标准=0.363、A 空白=0.005，按样本质量计算酶活得：
NR 活力 (U/g 质量) = 0.2 \times (A 测定 - A 对照) \div (A 标准 - A 空白) \div W = 0.117 U/g 质量。
2. 取 0.1g 洋桔梗叶片加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，离心取上清按照测定步骤操作，测得 A 测定=0.063、A 对照=0.032、A 标准=0.363、A 空白=0.005，按样本质量计算酶活得：
NR 活力 (U/g 质量) = 0.2 \times (A 测定 - A 对照) \div (A 标准 - A 空白) \div W = 0.173U/g 质量。



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