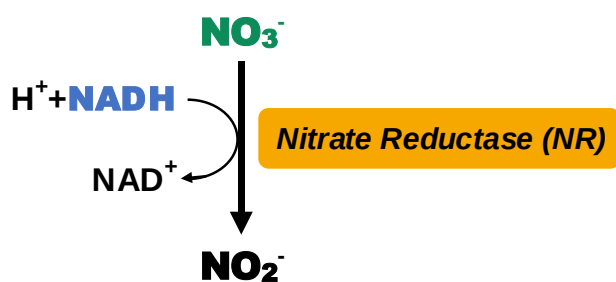




硝酸还原酶 (NR) 活性检测试剂盒

**Nitrate Reductase (NR) Activity Assay Kit**



北京盒子生工科技有限公司  
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



## 硝酸还原酶（NR）活性检测试剂盒

## Nitrate Reductase (NR) Activity Assay Kit

## 一、产品描述

硝酸还原酶（NR）是植物硝态氮转化为氨态氮的关键酶，受光和  $\text{NO}_3^-$  的诱导产生，可催化硝酸盐还原为亚硝酸盐，并与亚硝酸还原酶以偶联调节的形式对氮代谢进行调节，在初级氮同化的控制中起着重要作用。

硝酸还原酶可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 340 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可表征硝酸还原酶的活性。

## 二、产品内容

| 名称     | 试剂规格          | 储存条件       | 使用说明及注意事项                                          |
|--------|---------------|------------|----------------------------------------------------|
| 诱导剂储备液 | 液体 100 mL×1 瓶 | 4°C 保存     | 根据使用量蒸馏水 10 倍稀释后使用<br>(即为诱导剂应用液，现用现配)              |
| 试剂一    | 液体 130 mL×1 瓶 | 4°C 保存     | -                                                  |
| 试剂二    | 液体 12 mL×1 瓶  | -20°C 保存   | -                                                  |
| 试剂三    | 粉剂×2 瓶        | -20°C 避光保存 | 使用前每瓶加入 3 mL 试剂一充分溶解<br>(分装后 -20°C 可保存 2 周，避免反复冻融) |

## 三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿（光径 10 mm）/96 孔 UV 板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

## 1. 粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为 1：（5-10）的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 试剂一）处理样品，冰浴匀浆，4°C 8000 g 离心 10 min，取上清即为粗酶液，置于冰上待测。

注：植物样本一般不需诱导处理，若预实验结果没有活性（ $\Delta A$  测定  $\leq 0$ ）则需诱导处理：将新鲜标本洗净，滤纸吸干，放入装有适量诱导剂应用液的烧杯中（浸没即可），避光浸泡 2 h，取出样本，滤纸吸干后按组织程序提取。

## 2.测定步骤

①紫外分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 340 nm，蒸馏水调零。

②在 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中依次加入下列试剂：

| 试剂  | 测定组<br>( $\mu\text{L}$ ) | 空白组<br>( $\mu\text{L}$ ) |
|-----|--------------------------|--------------------------|
| 粗酶液 | 20                       | -                        |
| 试剂一 | 60                       | 80                       |
| 试剂二 | 100                      | 100                      |
| 试剂三 | 20                       | 20                       |

**吸光值测定：**①充分混匀并立即开始计时，测定 340 nm 处测定组和空白组初始吸光值，记为 A1 测定和 A1 空白；②25°C（其他物种）或 37°C（哺乳动物）准确反应 30 min，测定 340 nm 处测定组和空白组吸光值，记为 A2 测定和 A2 空白；③计算  $\Delta A$  测定=A1 测定-A2 测定， $\Delta A$  空白=A1 空白-A2 空白， $\Delta A = \Delta A$  测定- $\Delta A$  空白。注：空白组只需测 1-2 次。

## 3.硝酸还原酶（NR）活性计算

### 3.1 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每小时每 mg 组织蛋白消耗 1  $\mu\text{mol}$  NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NR (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^6}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} = \frac{6.431 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每小时每 g 组织样本消耗 1  $\mu\text{mol}$  NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NR (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}} \times 10^6}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times W \times T} = \frac{6.431 \times \Delta A}{W}$$

**注释：**V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，20  $\mu\text{L}$ =0.02 mL；V 提：粗酶液总体积，1 mL；V 反总：反应体系总体积，2 $\times 10^{-4}$  L；T：反应时间，30 min=0.5 h； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数：6220 L/mol/cm； $d_1$ ：96 孔 UV 板光径：0.5 cm；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g； $10^6$ ：单位换算系数，1 mol= $10^6$   $\mu\text{mol}$ 。

### 3.2 使用微量石英比色皿测定的计算公式

#### ①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每小时每 mg 组织蛋白消耗 1  $\mu\text{mol}$  NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NR (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^6}{\epsilon \times d_2 \times \text{Cpr} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{3.215 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

#### ②按组织样本质量计算

单位定义：每小时每 g 组织样本消耗 1  $\mu\text{mol}$  NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NR (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}} \times 10^6}{\epsilon \times d_2 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{3.215 \times \Delta A}{W}$$

**注释：** V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，20  $\mu\text{L}$ =0.02 mL；V 提：粗酶液总体积，1 mL；V 反总：反应体系总体积，2 $\times 10^{-4}$  L；T：反应时间，30 min=0.5 h； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数：6220 L/mol/cm； $d_2$ ：微量石英比色皿光径：1 cm；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g； $10^6$ ：单位换算系数，1 mol= $10^6$   $\mu\text{mol}$ 。

### 四、注意事项

- ①硝酸还原酶易失活，粗酶液制备过程需在冰上迅速完成；
- ②空白组为各试剂组分质量的检测孔，正常情况下变化不超过 0.05；
- ③准确在规定时间点完成吸光值的测定，以确保实验结果的准确性和重复性；
- ④试剂三有效期较短，为便于试验安排附赠 1 瓶作为备用，每瓶均可满足 100 个样本的测定；
- ⑤若 A 测定大于 1.2 或者  $\Delta A$  大于 0.5 时，建议将粗酶液适当稀释后再进行测定；若  $\Delta A$  测定小于 0.01，可适当延长酶促反应时间后再进行测定，计算时相应修改；
- ⑥为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

**For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.**

