

硝酸还原酶(NR)检测试剂盒 (NADH 速率法/微量法)

货号: PMK1069

保存: -20℃避光保存 12 个月

规格: 48T/96T

适用样本: 植物组织、藻类、细菌、真菌

产品简介

硝酸还原酶 (NR, EC 1.7.1.3) 是一种氧化还原酶, 可催化硝酸离子还原成亚硝酸离子的反应。广泛存在于高等植物、藻类、真菌及细菌中, 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。硝酸还原酶位于细胞质内或细胞膜外, 在硝酸盐还原途径中是限速因子, 使硝酸盐转换成亚硝酸盐。本试剂盒提供了一种简单的比色法来检测生物样本中硝酸还原酶活性。其原理是 NR 催化硝酸盐还原为亚硝酸盐, 伴随 NADH 氧化生成 NAD⁺, NADH 在 340nm 有特征吸收峰, 而 NAD⁺没有, 通过测定 340nm 光吸收下降速率, 即可反映 NR 活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
诱导剂储备液	25mL	50mL	4℃
提取液	60mL	120mL	4℃
试剂一	5mL	10mL	-20℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃保存

自备耗材

酶标仪或紫外分光光度计 (能测 340nm 处的吸光值) 及恒温培养箱
 96 孔 UV 微孔板或微量石英比色皿、可调节式移液枪及枪头
 去离子水
 匀浆器 (如果是组织样本)

试剂准备

诱导剂应用液的配制: 使用时将诱导剂储备液稀释 10 倍, 即按取 1mL 诱导剂储备液加 9mL 蒸馏水的比例, 充分混匀。

提取液: 即用型; 4℃保存。

试剂一: 即用型; 使用前平衡到室温; -20℃保存。

试剂二: 临用前每瓶加 2mL提取液溶解, 现配现用, 溶解后的试剂, 分装, -20℃保存。

样本制备

植物组织样品的前处理:

(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), 浸泡 2h, 取出样本, 滤纸吸干。

(2) 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 预冷的提取液, 冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

注意: 使用新鲜没有冷冻过的样本。一般不要诱导处理, 预测定结果没有活性 ($\Delta A \leq 0$) 则需要诱导处理。

细菌或真菌的前处理:

产品说明书

先收集 500 万细菌或真菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，离心后弃上清，加入 1mL 预冷的提取液，冰浴超声波破碎细胞 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），然后；8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

**注意：样品处理等过程均需要在冰上进行，且须在当日测定酶活力，匀浆液避免反复冻融。
如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 法蛋白质定量试剂盒，进行样本蛋白质浓度测定。**

实验步骤

1. 酶标仪或紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 340nm，紫外分光光度计去离子水调零。

样本测定：在 96 孔 UV 微孔板或微量石英比色皿中依次加入 50 μ L 样本上清，75 μ L 试剂一，50 μ L 去离子水，最后加入 25 μ L 试剂二。充分混匀后，测定 340nm 处的吸光值 A。记录 1min 时吸光值 A_1 和 6min 时吸光值 A_2 ， $\Delta A=A_1-A_2$ 。

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。如果样本测定没有活性（ $\Delta A \leq 0$ ）则需要诱导处理。

结果计算

NR 活性计算：

A. 使用 96 孔板测定的计算公式如下

（1）按样本鲜重计算：

单位定义：每 g 鲜重样品在反应体系中每分钟催化减少 1nmol NADH 的量为一个 NR 活力单位。

$NR \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反应}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 257.2 \times \Delta A \div W$

（2）按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化减少 1nmol NADH 的量为一个 NR 活力单位。

$NR \text{ (nmol/min/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 257.2 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

（3）按细胞数量计算：

单位定义：每 10^4 个细胞在反应体系中每分钟催化减少 1nmol NADH 的量为一个 NR 活力单位。

$NR \text{ (nmol/min/}10^4 \text{ Cells)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 0.514 \times \Delta A$

ϵ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d ：96 孔板光径，0.5cm； 10^9 ： $1\text{mol}=1 \times 10^9 \text{ nmol}$ ； $V_{\text{反应}}$ ：反应体系总体积（L）， $200 \mu\text{L}=2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.05mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； T ：反应时间，5min； C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/mL； W ：样本质量，g；500：细胞数量， 5×10^6 。

B. 使用微量比色皿进行测定的计算公式

将上述计算公式中光径 d ：0.5cm 调整为 d ：1cm 进行计算即可。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1074 NO 检测试剂盒（微量法）

PMK1022 谷胱甘肽还原酶（GR）检测试剂盒（微量法）

PMK1021 硫氧还蛋白氧化还原酶（TrxR）检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

