

硝酸还原酶(NR)检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1068BKM

保存：-20℃避光保存 12 个月

规格：48T/24S 96T/48S

检测范围：1μM-100μM（标准品的检测范围，需要根据样本情况折算为活性的检测范围）

灵敏度：1μM（标准品的灵敏度，需要根据样本情况折算为活性的灵敏度）

适用样本：植物组织、藻类、细菌、真菌、含菌水样等液体样本

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，产生的亚硝酸盐能够在酸性条件下，与磺胺及 N-（1-萘基）乙二胺二盐酸盐定量生成红色偶氮化合物；生成的红色偶氮化合物在 540nm 有最大吸收峰，测定其吸光值，可以反映 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	50mL	100mL	4℃
试剂一	5mL	10mL	-20℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃保存
试剂三	3mL	6mL	4℃，避光保存
试剂四	3mL	6mL	4℃，避光保存
标准品（1M NaNO ₂ ）	1mL	1mL	-20℃，避光保存

自备耗材

酶标仪或可见光分光光度计（能测 540nm 处的吸光值）及恒温培养箱
96 孔板或微量玻璃比色皿、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。

试剂三：即用型；使用前平衡到室温；实验过程中避光放置；避光 4℃保存。

产品说明书

试剂四：即用型；使用前平衡到室温；实验过程中避光放置；避光 4℃ 保存。

标准曲线设置：取 10 μ L NaNO₂ 标准品 (1M) 用 990 μ L 提取液稀释至 10mM NaNO₂。取 10 μ L 10mM 的 NaNO₂ 用 990 μ L 提取液稀释至 100 μ M NaNO₂。用 100 μ M NaNO₂ 按下表所示，进行下一步稀释：

	100 μ M NaNO ₂ (μ L)	提取液 (μ L)	浓度 (μ M)
Std. 1	200	0	100
Std. 2	100	100	50
Std. 3	40	160	20
Std. 4	20	180	10
Std. 5	10	190	5
Std. 6	4	196	2
Std. 7	2	198	1

注意：标准品现配现用；稀释后的标准溶液不稳定，必须在 4 小时内使用。

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 ($A_{测定} \leq A_{对照}$) 则需要诱导处理。

细菌或真菌的前处理：

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。

含菌水样：取 1mL 水样，研磨仪（球磨机）研磨，时间 60 秒，循环 2-3 次或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；10,000g 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. 酶标仪或可见光分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 540nm，可见光分光光度计去离子水调零。
2. 样本测定（在 96 孔板或微量玻璃比色皿中按照如下方式加样）：

试剂	空白孔 (μ L)	标准孔 (μ L)	测定孔 (μ L)	对照孔 (μ L)
样本	0	0	100	100
不同浓度标准品	0	100	0	0
去离子水	100	0	0	75
试剂一	75	75	75	0
试剂二	25	25	25	25
混匀后，25℃ 反应 10min				
试剂三	50	50	50	50
试剂四	50	50	50	50

产品说明书

充分混匀，室温孵育 20min，测定 540nm 处的吸光值 A。计算 $\Delta A_{测} = A_{测定} - A_{对照}$ 、 $\Delta A_{标} = A_{标准} - A_{空白}$ 。空白管只需做 1 管。每个测定孔设一个对照孔。

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 ($A_{测定} \leq A_{对照}$) 则需要诱导处理，诱导处理后的样本对照孔中试剂二改成加 25 μL 去离子水。如果样本吸光值大于 1.2，样本可用提取液进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量。

结果计算

1. 标准曲线的绘制

以标准溶液浓度为 y 轴， $\Delta A_{标}$ 为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。将样本的 $\Delta A_{测}$ 代入方程得到 y 值 ($1 \mu\text{M} = 1 \mu\text{mol/L} = 1\text{nmol/mL}$)。

1. NR 活性计算：

(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产生 1nmol NO_2^- 的量为一个 NR 活力单位。

$\text{NR (U/g 鲜重)} = y \times V_{反总} \div (V_{样} \div V_{样总} \times W) \div T = 0.2y \div W$

(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产生 1nmol NO_2^- 的量为一个 NR 活力单位。

$\text{NR (U/mg prot)} = y \times V_{反总} \div (V_{样} \times \text{Cpr}) \div T = 0.2y \div \text{Cpr}$

(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产生 1nmol NO_2^- 的量为一个 NR 活力单位。

$\text{NR (U}/10^4 \text{ Cells)} = y \times V_{反总} \div (V_{样} \div V_{样总} \times 500) \div T = 0.0004y$

(4) 按液体体积计算：

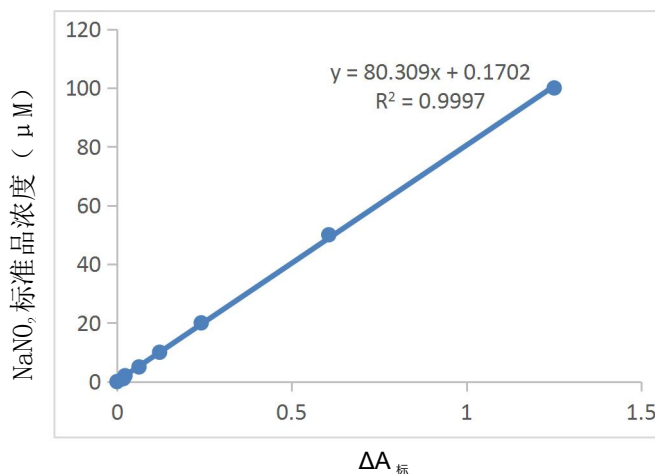
单位定义：每 mL 样本在反应体系中每小时催化产生 1nmol NO_2^- 的量为一个活力单位 U。

$\text{NR (U/mL)} = y \times V_{反总} \div V_{样} \div T = 0.2y$

$V_{反总}$ ：反应体系总体积， $200 \mu\text{L} = 0.2\text{mL}$ ； $V_{样}$ ：加入样本体积：0.1mL； $V_{样总}$ ：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，10min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本鲜重，g；500：细胞数量， 5×10^6 。

结果展示

典型标准曲线-以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



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。

产品说明书

相关产品：

PMK1074BKM NO 检测试剂盒（微量法）

PMK1022BKM 谷胱甘肽还原酶（GR）检测试剂盒（微量法）

PMK1021BKM 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：

