硝酸还原酶（NR）活性检测试剂盒（微量法）
（本试剂盒仅供科研使用）

产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0078	硝酸还原酶（NR）活性检测试剂盒	100 管/96 样

产品内容

名称	规格	储存条件
诱导剂储备液	液体 100mL ×1 瓶: 临用前 10 倍稀释（即取 10mL 诱导剂储备液加入 90mL 蒸馏水，充分混匀），现配现用。	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：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℃可保存 2 周。	-20℃

一、产品说明

硝酸还原酶（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，$NO3^{-}$ +NADH+H + → $NO2^{-}$ +NAD + +H2O，NADH 在 340nm 下有特征吸收峰，340nm 下吸光值的变化即可表示酶活。

二、自备材料

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。

三、样品制备

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。

四、操作步骤

正式测定前，必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

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 A1，37℃反应 30min 后再次测定吸光值 A2，计算△A 测定管=A1 测定管-A2 测定管，△A 空白管= A1 空白管-A2 空白管，△A=△A 测定管-△A 空白管。**空白管只需测 1-2 次。**

五、NR 活性的计算

A. 使用 96 孔 UV 板检测的计算公式如下：

1、按照样本蛋白浓度计算：

酶活单位定义：每小时每 mg 组织蛋白消耗 1μmoL NADH 的量为一个 NR 活力单位。

NR（U/mg prot）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^6]÷(V 样×Cpr) ÷T=8.932×ΔA÷Cpr。

需要另外测定，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

2、按照样本鲜重计算：

酶活单位定义：每小时每 g 鲜重样品中消耗 1μmoL NADH 的量为一个 NR 活力单位。

NR（U/g 鲜重）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^6]÷(W÷V 提取×V 样) ÷T=8.932×ΔA÷W。

V 反总：反应体系体积，0.001L；V 样：吸取样本体积，0.06mL；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：6220 L/moL/cm；d：比色皿光径：0.6cm；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本鲜重，g；10^6：单位换算系数，1moL=10^6μmoL。

B. 使用微量石英比色皿检测的计算公式如下：

1、按照样本蛋白浓度计算：

酶活单位定义：每小时每 mg 组织蛋白消耗 1μmoL NADH 的量为一个 NR 活力单位。

NR（U/mg prot）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^6]÷(V 样×Cpr) ÷T=5.359×ΔA÷Cpr。

需要另外测定，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

2、按照样本鲜重计算：

酶活单位定义：每小时每 g 鲜重样品中消耗 1μmoL NADH 的量为一个 NR 活力单位。

NR（U/g 鲜重）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^6]÷(W÷V 提取×V 样) ÷T=5.359×ΔA÷W。

V 反总：反应体系体积，0.001L；V 样：吸取样本体积，0.06mL；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：6220 L/moL/cm；d：比色皿光径：1cm；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本鲜重，g；10^6：单位换算系数，1moL=10^6μmoL。

六、注意事项

1、 当测定的吸光值大于 1.5 或者ΔA 大于 0.6 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品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。