

组织及血液硝酸还原酶（NR）活性检测试剂盒 （Griess 显色法）说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AMHA8-C24	组织及血液硝酸还原酶（NR）试剂盒	24T	常量法

产品说明:

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 540 nm 处有吸收峰, 540 nm 下吸光值的变化即可表示酶活。

试剂组成:

试剂名称	规格	保存条件
诱导剂储备液	液体 50 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
提取液	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂一	液体 12 mL×1 瓶	-20℃ 保存
试剂二	粉剂×2 支	-20℃ 保存
试剂三	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂四	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃ 保存

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 10 mL 诱导剂储备液加 90 mL 蒸馏水, 充分混匀。现配现用。
- 2、试剂二: 加入 1 mL 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 10 μL 试剂二加入 490 μL 蒸馏水混匀。
- 3、标准品: 10 μmol/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 0.1 μmol/mL 的亚硝酸钠标准液, 备用。

操作步骤:

一、样本处理

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 2 h, 取出样本, 滤纸吸干后, -20℃ 冷冻 30 min, 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进行诱导处理)

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

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30 min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 μmol/mL标准溶液	-	-	100	-
蒸馏水	-	375	-	475
试剂一	375	-	375	-
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20 min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 NO₂的量为 1 个NR 活力单位。

$$\text{NR 活力 (U/mg prot)} = \frac{C \text{ 标准} \times (A \text{ 测定} - A \text{ 对照})}{(A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times V \text{ 样本}} \div (V \text{ 样本} \times Cpr) \\ \div T \times F = 0.2 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 对照}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div Cpr \times F$$

(2) 按样本质量计算：

酶活定义：每小时每 g 组织催化产生 1 μmol NO₂的量为 1 个NR 活力单位。

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

(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 NO₂的量为 1 个NR 活力单位。

NR 活力 (U/10⁴ cell)

$$= \frac{C \text{ 标准} \times (A \text{ 测定} - A \text{ 对照})}{(A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times V \text{ 样本}} \div (\text{细胞或细菌数量} \times V \text{ 样本} \div V \text{ 提取}) \\ \div T \times F = 0.2 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 对照}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div \text{细胞或细菌数量} \times F$$

C 标准：亚硝酸钠标准溶液浓度，0.1 μmol/mL；V 提取：加入提取液体积，1 mL；W：样本质量，g；T：反应时间，0.5 h；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；V 样本：加入的样本体积，0.1 mL；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。