

## 植物硝酸还原酶（NR）检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
PMHA8-C24	硝酸还原酶(NR)试剂盒	24T	常量法
PMHA8-C48		48T	常量法

### 一、测定意义

硝酸还原酶广泛存在于植物中，是植物氮素同化的限速酶，可直接调节硝酸盐还原，从而调节氮代谢，并影响到光合碳代谢，其活性水平与植物体内多种代谢过程和生理指标有关。

### 二、测定原理

硝酸还原酶催化硝酸盐还原为亚硝酸盐，在酸性条件下，产生的  $\text{NO}_2^-$  能够参与重氮化反应生成红色偶氮化合物，该物质在波长 540 nm 处有吸收峰，测定其吸光度值的变化来计算硝酸还原酶的活性。

### 三、试剂组成

试剂名称	试剂装量 (24T)	试剂装量(48T)	保存条件
诱导剂储备液	液体 30 mL×1 瓶	液体 50 mL×1 瓶	4℃ 保存
诱导剂应用液的配制：用时将诱导剂储备液用蒸馏水稀释 10 倍，充分混匀。			
提取液	液体 30mL×1 瓶	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂一	液体 15mL×1 瓶	液体 25mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂二	粉剂 ×1 支	粉剂 ×2 支	4℃ 保存
试剂二的配置：每支粉剂加入蒸馏水 1mL，充分溶解，-20℃ 保存。临用前用蒸馏水将试剂二稀释 100 倍，备用，即取 10 μL 试剂二加入 990 μL 蒸馏水混匀。			
试剂三	液体 15mL×1 瓶	液体 25mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂四	液体 15mL×1 瓶	液体 25mL×1 瓶	4℃ 保存
标准品 (10μmol/mL)	液体 1mL×1 支	液体 1mL×1 支	4℃ 保存
0.1μmol/mL 标准品的配制：将标准品用蒸馏水 100 倍稀释即可，现用现配。			

### 四、操作步骤

#### 样本前处理

(1) 取适量诱导应用液于烧杯中，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。

(2) 植物组织提取液的制备：取一定量植物组织擦净水分及杂质，剪碎后放入研钵，加入液氮，研磨成粉状后转移出来，然后准确称重，按照组织质量 (g)：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），

漩涡混匀抽提 3-5 分钟或者使用组织破碎仪冰浴提取，8000g，4℃离心 10min，取上清液置冰上待测。

### 测定步骤

- 1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 540nm，用蒸馏水调零。
- 2、试剂回复至常温；
- 3、操作表：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管	空白管
样本 (μL)	100	100	-	-
0.1μmol/mL 标准品 (μL)	-	-	100	-
蒸馏水 (μL)	-	400	-	100
试剂一 (μL)	400	-	400	400
试剂二 (μL)	100	100	100	100
混匀后，37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）水浴 30min				
试剂三 (μL)	200	200	200	200
试剂四 (μL)	200	200	200	200
混匀，25℃室温静置 20min，540nm 下比色				

## 五、植物样本中硝酸还原酶活性计算

### (1) 按样本鲜重计算：

单位定义：每小时每 g 鲜重样中催化产生 1μmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 的量为一个 NR 活力单位。

$$\begin{aligned}
 \text{NR活力} &= \frac{(\text{测定OD} - \text{对照OD})}{(\text{标准OD} - \text{空白OD})} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(0.1\mu\text{mol/mL})} \times \frac{V1}{W \times V1 \div V1} \div T \\
 &= 0.2 \times \frac{(\text{测定OD} - \text{对照OD})}{(\text{标准OD} - \text{空白OD})} \div W
 \end{aligned}$$

### (2) 按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每小时每 mg 组织蛋白催化产生 1μmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 的量为一个 NR 活力单位。

$$\begin{aligned}
 \text{NR活力} &= \frac{(\text{测定OD} - \text{对照OD})}{(\text{标准OD} - \text{空白OD})} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(0.1\mu\text{mol/mL})} \times \frac{V1}{Cpr \times V1} \div T \\
 &= 0.2 \times \frac{(\text{测定OD} - \text{对照OD})}{(\text{标准OD} - \text{空白OD})} \div Cpr
 \end{aligned}$$

**V1:** 加入样本体积，0.1mL；

**V2:** 加入提取液体积，1mL；

**T:** 反应时间，0.5h；

**Cpr:** 样本蛋白质浓度，mg/mL；

**W:** 样本鲜重，g。

## 六、注意事项

- 1、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诱导处理。
- 2、样本活性比较低的时候，可以适当增加样本的取样量或者增加样本提取浓度。

3、本反应显色 1h 较为稳定，在此时间内比色较好。

## 七、公司介绍

陌凡生物科技有限公司是一家专业从事转基因检测、食品安全以及动植物疫病检测为核心业务的生物科技公司。能够为客户提供动植物疫病检测试剂、小分子抗原抗体、植物激素、植物抗体、重组蛋白等优质产品。自主研发了涵盖分子生物学、细胞生物学、免疫学、生物医学等领域的各种试剂盒。产品覆盖面广，品质可靠。