

硝酸还原酶（Nitrate Reductase, NR）活性测定试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义

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。

测定原理

NR 催化硝酸盐还原为亚硝酸盐， $\text{NO}_3^- + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$ ；NADH 在 340 nm 有最大吸收峰，通过测定 NADH 减少速率来表示 NR 活性。

需自备的仪器和用品

酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

诱导剂储备液：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

提取液：液体 120mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 10mL×1 瓶，-20℃ 保存。

试剂二：粉剂×2 瓶，-20℃ 保存；临用前每瓶加 2mL 提取液溶解，现配现用。

诱导剂应用液的配制：用时将诱导剂储备液稀释 10 倍，即取 10mL 诱导剂储备液加 90mL 蒸馏水，充分混匀。

动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）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），进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

注意：

- 1、建议使用新鲜没有冷冻过的样本。
- 2、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。

细菌或培养细胞的前处理：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；8000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤

1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。

2、样本测定

在 96 孔板中依次加入 10 μ L 样本上清，75 μ L 试剂一，90 μ L 蒸馏水，最后加入 25 μ L 试剂二。充分混匀后，记录 1min 时吸光值 A1 和 6min 时吸光值 A2， $\Delta A = A1 - A2$ 。

NR 活性计算:

(1) 按样本鲜重计算:

单位定义: 每 min 每 g 鲜重样品中催化减少 1nmol NADH 的量为一个 NR 活力单位。

$$\text{NR (nmol/min/g 鲜重)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div W$$

(2) 按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每 min 每 mg 组织蛋白催化减少 1nmol NADH 的量为一个 NR 活力单位。

$$\text{NR (nmol/min/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1286 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

V 反总: 反应体系总体积, 0.2mL; 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; V 样: 加入样本体积, 0.01mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 5 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g