

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

分光光度法 50 管/48 样

**注 意：** 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， $\text{NO}_3^- + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$ ；产生的亚硝酸盐能够在酸性条件下，与对-氨基苯磺酸及  $\alpha$ -萘胺定量生成红色偶氮化合物；生成的红色偶氮化合物在 540 nm 有最大吸收峰，可用分光光度法测定。

### 需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、水浴锅、台式离心机、1mL 玻璃比色皿、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 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 10mL×1 瓶，-20℃ 保存。

试剂二：液体 8mL×1 瓶，-20℃ 保存；

试剂三：液体 15mL×1 瓶，4℃ 保存，（如出现结晶析出，60℃-90℃ 水浴溶解后使用）；

试剂四：液体 15mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂五：标准储备液 1mL，-20℃ 保存。

### 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。

0.1  $\mu\text{mol/mL}$  的标准液的配制：用时将试剂五稀释 100 倍，即取 0.1ml 试剂五加 9.9mL 蒸馏水，充分混匀。

### 样品的前处理

#### 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（A 测定管  $\leq$  A 对照管）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、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 540nm, 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)	加样孔			
	测定管	对照管	标准管	空白管
样本	100	100		
0.1 μmol/mL 标准液			100	
蒸馏水		375		475
试剂一	375		375	
试剂二	125	125	125	125

混匀后, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 30min

试剂三	250	250	250	250
试剂四	250	250	250	250

混匀, 25℃ 室温显色 20min, 540nm 下比色

**注意:**

- 1、标准管和空白管只需测一次, 每个测定管设一个对照管。
- 2、诱导处理后的样本对照管中试剂二改成加 125 μL 蒸馏水。

**NR 活性计算:**

(1) 按样本鲜重计算:

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

$$NR (\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = (C \text{ 标准管} \times V1) \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div (W \times V1 \div V2) \div T = 0.2 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W$$

(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。

$$NR (\mu\text{mol/h/mg prot}) = (C \text{ 标准管} \times V1) \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div (V1 \times Cpr) \div T = 0.2 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div Cpr$$

C 标准管: 标准管浓度, 0.1μmol/mL; 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。