

## 硝酸还原酶(NR)检测试剂盒(萘胺比色法)

### 产品简介:

硝酸还原酶(Nitrate reductase, NR)是一种氧化还原酶,可分为参与硝酸盐同化的同化型还原酶和催化以硝酸盐为活体氧化的最终电子受体的硝酸盐呼吸异化型(呼吸型)还原酶。硝酸还原酶是植物氮素代谢中氮素同化的关键酶,该酶与作物吸收利用氮肥有关,对作物的产量和质量有影响,因此可以把硝酸还原酶的活力当作营养诊断养、农田施肥或作物育种的生理生化指标。

Yuan ye 硝酸还原酶(NR)检测试剂盒(萘胺比色法)检测原理是 NR 催化硝酸盐还原为亚硝酸盐,其反应如下:  $\text{NO}_3^- + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$ 。产生的亚硝酸盐与磺胺、萘胺在酸性条件下定量生成稳定的红色偶氮化合物,于分光光度计 520nm 处检测吸光度,以吸光度变化所需萘胺进行计算,该试剂盒主要用于检测植物样本、血清等中硝酸还原酶活性,尤其适用于植物体内硝酸还原酶的活力。该试剂盒仅用于科研领域,不宜用于临床诊断或其他用途。

### 产品组成:

| 名称  | 编号 | R30328 | R30328 | Storage                |
|---|----|--------|--------|------------------------|
|   |    | 50T    | 100T   |                        |
| 试剂(A): 亚硝态氮标准(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) |    | 1ml    | 1ml    | 4 $^{\circ}\text{C}$   |
| 试剂(B): NR Lysis buffer                      |    | 250ml  | 500ml  | RT                     |
| 试剂(C): NR Assay buffer                      |    | 30ml   | 50ml   | RT                     |
| 试剂(D): 硝酸盐缓冲液                               |    | 35ml   | 80ml   | RT                     |
| 试剂(E): NADH                                 |    | 2 支    | 3 支    | -20 $^{\circ}\text{C}$ |
| 试剂(F): NR 终止液                               |    | 30ml   | 60ml   | RT 避光                  |
| 试剂(G): 萘胺显色液                                |    | 30ml   | 60ml   | RT 避光                  |
| 使用说明书                                       |    |        | 1 份    |                        |

### 自备材料:

- 1、蒸馏水
- 2、离心管或试管
- 3、匀浆器或研钵
- 4、恒温箱或水浴锅
- 5、低温离心机

6、比色杯

7、分光光度计

操作步骤(仅供参考):

1、准备样品:

①植物样品: 取 0.5g 植物组织(根系)清洗干净, 切碎, 置于-20℃冰箱 30min, 按植物组织: NR Lysis buffer=0.5g: 4ml 的比例, 加入预冷的 NR Lysis buffer, 冰浴情况下充分匀浆或研磨, 4℃ 4000g 离心 15~20min, 留取上清液即为硝酸还原酶粗提液, 4℃ 保存待用。

②血浆、血清和尿液样品: 血浆、血清按照常规方法制备后可以直接用于本试剂盒的测定, -20℃冻存, 用于硝酸还原酶的测定。

③高活性样品: 如果样品中含有较高活性的硝酸还原酶, 可以使用 NR Lysis buffer 进行恰当的稀释。

2、稀释系列亚硝态氮标准: 取适量的亚硝态氮标准(100μg/ml), 按亚硝态氮标准(100μg/ml): 蒸馏水=1: 99 的比例混合, 即获得亚硝态氮标准(1μg/ml), 然后按下表进行稀释:

| 加入物(ml)        | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6 |
|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| 亚硝态氮标准(1μg/ml) | 0.1 | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1 |
| 蒸馏水            | 0.9 | 0.8 | 0.6 | 0.4 | 0.2 | 0 |
| 每管亚硝态氮含量(μg)   | 0.1 | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1 |

3、配制 NADH 工作液: 取 1 支 NADH 恢复至室温, 完全溶解于 10ml NR Assay buffer, 即得 NADH 工作液。4℃预冷备用, -20℃保存 1 周有效。注意: NADH 易失效, 该试剂盒多送 1 支 NADH 备用。

4、NR 加样: 按照下表设置空白管、对照管、标准管、测定管, 溶液应按照顺序依次加入, 并注意避免产生气泡。如果样品中的酶活性过高, 可以减少样品用量或适当稀释后再进行检测, 样品的检测最好能设置 2 平行管, 求平均值。

| 加入物(ml)         | 空白管 | 标准管 | 对照管 | 测定管 |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|
| NR Assay buffer | —   | —   | 0.2 | —   |
| 系列亚硝态氮标准(1~6 号) | —   | 1   | —   | —   |
| 待测样品(硝酸还原酶粗提液)  | —   | —   | —   | 0.2 |
| 蒸馏水             | 1   | —   | —   | —   |

|          |   |   |     |     |
|----------|---|---|-----|-----|
| 硝酸盐缓冲液   | — | — | 0.6 | 0.6 |
| NADH 工作液 | — | — | 0.2 | 0.2 |

混匀，25℃孵育 30min，立即加入 NR 终止液。

|        |     |     |     |     |
|--------|-----|-----|-----|-----|
| NR 终止液 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| 萘胺显色液  | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |

- 5、绘制亚硝态氮标准曲线：取系列标准管(1~6 号)及空白管中液体，以空白管调零，比色杯光径 1.0cm，以分光光度计测定 520nm 处系列标准管(1~6 号)吸光度，以 1~6 号亚硝态氮含量( $\mu\text{g}$ )为横坐标，以对应的吸光度为纵坐标，绘制亚硝态氮标准曲线。
- 6、NR 测定：对照管、测定管孵育 15min，4℃ 4000g 离心 15min，取上清液待用，比色杯光径 1.0cm，以对照调零，以分光光度计测定 520nm 处测定管的吸光度。

计算：

以亚硝态氮含量(1~6 号)为横坐标，以对应的吸光度为纵坐标，绘制亚硝态氮标准曲线，根据亚硝态氮含量与吸光度关系直接计算回归方程，根据回归方程计算出反应体系中亚硝态氮含量。按下公式计算样品中的 NR 活性：

$$\text{NR}(\mu\text{g/g} \cdot \text{h}) = X \times V_1 / (W \times t \times V_2)$$

式中：X=根据标准曲线计算出酶粗提液中亚硝态氮含量( $\mu\text{g}$ )

$V_1$ =提取酶液时加入的缓冲液体积(ml)=4

W=植物新鲜重量(g)

t=孵育时间(h)=0.5

$V_2$ =加样时加入的提取酶液体积(ml)=0.2

注意事项：

- 1、硝酸还原酶容易失活，提取和测定时应操作迅速，尽量在 4℃ 操作。
- 2、如果测定植物样本，取样最好在晴天进行，最好提前一天施些硝态氮肥，取样部位应一致。
- 3、加入 NADH 工作液后，应在避光条件下进行，以防亚硝酸盐还原为氨。
- 4、显色和比色时间应一致，显色时间过长或过短对颜色都有影响。
- 5、如果没有分光光度计，也可以使用普通的酶标仪测定，但应注意酶标板每孔的最大测定体积。
- 6、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期：6 个月有效。