

硝酸还原酶（Nitrate Reductase, NR）活性测定试剂盒

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， $\text{NO}_3^- + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$ ；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：

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 60mL×1 瓶，4℃保存。

试剂一：液体 20mL×1 瓶，-20℃保存。

试剂二：粉剂×2 瓶，-20℃保存；临用前每瓶加 4mL 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、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。

2、样本测定

在 1mL 玻璃比色皿中依次加入 50 μ L 样本上清, 375 μ L 试剂一, 450 μ L 蒸馏水, 最后加入 125 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。NR (nmol/min/g 鲜重) = $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 109 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643 \times \Delta A \div W$

(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。NR (nmol/min/mg prot) = $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 109 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 643 \times \Delta A \div \text{Cpr}$

V 反总: 反应体系总体积, 1mL; ϵ : NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.05mL; 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