

硝酸还原酶 (NR) 活性检测试剂盒 (Griess 显色法) 说明书

可见分光光度法

货号: D100678

规格: 50T/24S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
诱导剂储备液	液体 50 mL×1 瓶	2-8°C保存
提取液	液体 30mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 12 mL×1 瓶	-20°C保存
试剂二	粉剂×2 支	-20°C保存
试剂三	液体 15 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂四	液体 15 mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8°C保存

溶液的配制:

- 1、诱导液: 将诱导剂储备液用蒸馏水 10 倍稀释后使用, 即取 10 mL 诱导剂储备液加 90 mL 蒸馏水, 充分混匀。现配现用。
- 2、试剂二: 加入 1mL 蒸馏水, -20°C分装保存, 可以-20°C保存 2 周。临用前用蒸馏水将试剂二稀释 50 倍, 备用, 即取 10 μ L 试剂二加入 490 μ L 蒸馏水混匀。
- 3、试剂三: 若该试剂有析出, 可 40°C溶解使用。
- 4、标准品: 10 μ mol/mL 亚硝酸钠标准溶液。临用前将用蒸馏水标准溶液稀释 100 倍得到 0.1 μ mol/mL 的亚硝酸钠标准液, 备用。

产品说明:

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。NR 催化硝酸盐还原为亚硝酸盐, $\text{NO}_3^- + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$ 。在酸性条件下, 产生的 NO_2^- 能够参与重氮化反应生成紫红色化合物, 这种紫红色化合物在 540 nm 处有吸收峰, 540 nm 下吸光值的变化即可表示酶活。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、水浴锅/培养箱、台式离心机、1 mL 玻璃比色皿、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

1、组织前处理:

(1) 取适量诱导液于烧杯中，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。（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进行诱导处理）

(2) 按照组织质量(g)：提取液体积(mL)为 1:5~10 的比例(称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL 提取液)，冰浴研磨，8000g，4℃离心 10 min，取上清置冰上待测。

2、细胞或细菌的前处理：

先收集细胞或细菌样本到离心管内，弃上清，按照每 500 万细胞或细菌加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）。8000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

二、测定步骤

1、可见分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 540 nm，蒸馏水调零。

2、样本测定：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管	空白管
样本	100	100	-	-
0.1 μmol/mL 标准溶液	-	-	100	-
蒸馏水	-	375	-	475
试剂一	375	-	375	-
试剂二	125	125	125	125
混匀，37℃(哺乳动物)或 25℃(其他物种)反应 30 min				
试剂三	250	250	250	250
试剂四	250	250	250	250
混匀，室温显色 20 min 后测定 540nm 下的吸光度，分别记为 A 测定、A 对照、A 标准、A 空白。				

三、NR 活性计算

(1) 按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每小时每 mg 组织蛋白催化产生 1 μmol NO₂⁻ 的量为 1 个 NR 活力单位。

$$\text{NR 活力(U/mg prot)} = C_{\text{标准}} \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times F \\ = 0.2 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}} \times F$$

(2) 按样本质量计算：

酶活定义：每小时每 g 组织催化产生 1 μmol NO₂⁻ 的量为 1 个 NR 活力单位。

$$\text{NR 活力(U/g 质量)} = C_{\text{标准}} \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times V_{\text{样本}} \div (W \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}}) \div T \times F \\ = 0.2 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times F$$

(3) 按细胞数量计算：

酶活定义：每小时每 1 万个细胞或细菌催化产生 1 μmol NO₂⁻ 的量为 1 个 NR 活力单位。

$$\text{NR 活力(U/10}^4 \text{ cell)}$$

$$=C \text{ 标准} \times (A \text{ 测定} - A \text{ 对照}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times V \text{ 样本} \div (\text{细胞或细菌数量} \times V \text{ 样本} \div V \text{ 提取}) \div T \times F$$
$$=0.2 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 对照}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div \text{细胞或细菌数量} \times F$$

C 标准: 亚硝酸钠标准溶液浓度, 0.1 $\mu\text{mol/mL}$; V 提取: 加入提取液体积, 1 mL; W: 样本质量, g; T: 反应时间, 0.5 h; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; V 样本: 加入的样本体积, 0.1 mL; 细胞或细菌数量: 以万计; F: 样本稀释倍数。

注意事项:

1. 吸光度大于 0.8 时, 建议用提取液稀释样本, 注意计算公式中参与计算的稀释倍数要相应改变。
2. 严格按照样本测定表格列出顺序加入试剂进行实验。

实验实例:

1. 取 0.1 g 绿萝叶片加入 1 mL 提取液进行匀浆研磨, 离心取上清按照测定步骤操作, 测得 A 测定 = 0.072、A 对照 = 0.051、A 标准 = 0.363、A 空白 = 0.005, 按样本质量计算酶活得:
NR 活力 (U/g 质量) = $0.2 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 对照}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W = 0.117 \text{ U/g 质量}$ 。
2. 取 0.1 g 洋桔梗叶片加入 1 mL 提取液进行匀浆研磨, 离心取上清按照测定步骤操作, 测得 A 测定 = 0.063、A 对照 = 0.032、A 标准 = 0.363、A 空白 = 0.005, 按样本质量计算酶活得:
NR 活力 (U/g 质量) = $0.2 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 对照}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W = 0.173 \text{ U/g 质量}$ 。

