

硝酸还原酶（NR）活性检测试剂盒（Griess 显色法）说明书

微量法

货号：AC10769

规格：100T/48S

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 100 mL×1 瓶	4°C保存
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 5 mL×1 瓶	-20°C保存
试剂二	粉剂×2 支	-20°C保存
试剂三	液体 6 mL×1 瓶	4°C保存
试剂四	液体 6 mL×1 瓶	4°C保存
标准品	液体 1 mL×1 支	4°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 μL 试剂二加入 490 μL 蒸馏水混匀。
- 3、标准品：10 μmol/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 μmol/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。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、微量玻璃比色皿/96 孔板、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°C 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°C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°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

二、测定步骤

1、可见分光光度计/酶标仪预热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	20	20	-	-
0.1 μmol/mL标准溶液	-	-	20	-
蒸馏水	-	75	-	95
试剂一	75	-	75	-
试剂二	25	25	25	25
混匀, 37°C(哺乳动物)/25°C(其他物种)反应30 min				
试剂三	50	50	50	50
试剂四	50	50	50	50
混匀, 室温显色20 min, 吸取200 μL至比色皿或96孔板中, 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

NR 活力计算:

(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。

$$\begin{aligned} \text{NR 活力 (U/mg prot)} &= C \text{ 标准} \times (A \text{ 测定} - A \text{ 对照}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times V \text{ 样本} \div (V \text{ 样本} \times C_{\text{pr}}) \div T \times F \\ &= 0.2 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 对照}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div C_{\text{pr}} \times F \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算:

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

$$\begin{aligned} \text{NR 活力 (U/g 质量)} &= C \text{ 标准} \times (A \text{ 测定} - A \text{ 对照}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \times V \text{ 样本} \div (W \times V \text{ 样本} \div V \text{ 提取}) \div T \times F \\ &= 0.2 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 对照}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W \times F \end{aligned}$$

(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。

NR 活力 (U/10⁴ cell)

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

C 标准: 亚硝酸钠标准溶液浓度, 0.1 μmol/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; C_{pr}: 样本蛋白浓度, mg/mL; V 样本: 加入的样本体积, 0.02 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 1 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，用 96 孔板测得 A 测定=0.078、A 对照=0.070、A 标准=0.268、A 空白=0.046，按样本质量计算酶活得：
NR 活力 (U/g 质量) = $0.2 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 对照}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W = 0.0721 \text{ U/g 质量}$ 。
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，用 96 孔板测得 A 测定=0.088、A 对照=0.064、A 标准=0.268、A 空白=0.046，按样本质量计算酶活得：
NR 活力 (U/g 质量) = $0.2 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 对照}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W = 0.216 \text{ U/g 质量}$ 。