

硝酸还原酶(NR)活性检测试剂盒

Nitrate Reductase Assay Kit

微量法

货号: AK209

规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
诱导剂储备液	50mL×1 瓶	4℃保存;
诱导剂应用液配制: 用时将诱导剂储备液用蒸馏水 10 倍稀释, 充分混匀即可。		
提取液 ES08	50mL×1 瓶	4℃保存;
AK209-A	10mL×1 瓶	-20℃保存;
AK209-B	5mL×1 瓶	4℃保存;
AK209-C	5mL×1 瓶	4℃保存 (如析出结晶, 60 度水浴溶解后使用);
AK209-D	5mL×1 瓶	4℃避光保存;
AK209-标准储备液	1 mL×1 支	4℃保存
1μmol/mL 的标准液的配制: 用时将 AK209-标准储备液蒸馏水 10 倍稀释, 充分混匀即可。		

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 硝酸还原酶 (Nitrate Reductase, 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。

原理: 硝酸还原酶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 α-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。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

样品测定的前处理:

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, 滤纸吸干后, -20℃冷冻 30min, 取出样本, 滤纸吸干。(根据需要进行诱导处理)
2. 按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液 ES08), 进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤:

1. 分光光度计或酶标仪预热30min 以上, 调节波长至540nm, 蒸馏水调零。
2. 在EP 管或96 孔板中加入下列试剂

试剂名称	测定管(ul)	对照管(ul)	标准管(ul)	空白管(ul)
样本	20	20		
1μmol/mL 标准液			20	
蒸馏水		100		120
AK209-A	75		75	
AK209-B	25		25	
混匀后, 37℃ (哺乳动物) 或25℃ (其它物种) 反应30min				

AK209-C	50	50	50	50
AK209-D	50	50	50	50
混匀，显色20min，540nm 处比色，标记为：A 测定管、A 对照管、A 标准管、A 空白管；				

注意：标准管和空白管只需测 1-2 次，每个测定管设一个对照管。

硝酸还原酶 (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 $1\mu\text{mol NO}_2^-$ 的量为一个 NR 活力单位。

$$\text{NR } (\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = (\text{C 标准管} \times \text{V1}) \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div (\text{W} \times \text{V1} \div \text{V2}) \div \text{T} \\ = 2 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{W}$$

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 $1\mu\text{mol NO}_2^-$ 的量为一个 NR 活力单位。

$$\text{NR } (\mu\text{mol/h/mg prot}) = (\text{C 标准管} \times \text{V1}) \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div (\text{V1} \times \text{Cpr}) \div \text{T} \\ = 2 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{Cpr}$$

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit (C05-02001)

注： C 标准管：标准管浓度， $1\mu\text{mol/mL}$ ； V1：加入样本体积：0.02mL； 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。