

硝酸还原酶 (NR) 检测试剂盒(离体微板法)

产品货号: BA1733

产品规格: 100T

产品简介:

硝酸还原酶 (Nitrate Reductase, NR, EC1.7.1.3) 广泛存在于植物中, 是植物硝态氮转化为氨态氮的关键酶, 它的活性高低直接影响到植物对土壤中硝态氮素的利用, 影响作物的产量和品质。硝酸还原酶是一种诱导酶, 通常在有 NO_3^- 存在时, 会诱导硝酸还原酶的活性。

测定原理: NR 催化硝酸盐还原为亚硝酸盐, $\text{NO}_3^- + \text{NADH} \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$; 产生的亚硝酸盐能够在酸性条件下, 与对-氨基苯磺酸 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 540nm 有最大吸收峰, 可用分光光度法测定。

按照每次提取使用 1ml 提取缓冲液计算, 该产品可以使用 45-50 次。

产品内容:

试剂名称	规格	保存条件
试剂 1-NR 诱导剂 (50 \times)	10ml	4 $^{\circ}\text{C}$
试剂 2-NR 提取缓冲液 (2 \times)	25ml	4 $^{\circ}\text{C}$
试剂 3-NR 分析缓冲液	25ml	4 $^{\circ}\text{C}$
试剂 4-NADH (10 \times)	1.2ml	-20 $^{\circ}\text{C}$
试剂 5-显色液 1	15ml	4 $^{\circ}\text{C}$
试剂 6-显色液 2	15ml	4 $^{\circ}\text{C}$
试剂 7-标准液 (100 \times)	1ml	-20 $^{\circ}\text{C}$
1M DTT	1ml	-20 $^{\circ}\text{C}$

需自备的仪器和用品:

植物根茎、叶子等; 剪刀; 离心管; 分光光度计; 水浴锅; 离心机; 1ml 比色皿

操作步骤 (仅供参考):

用前必读: 由于不同材料 NR 活性差距较大, 首次实验时建议取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

准备 30 度水浴; 分光光度计调节到 540nm, 开机预热 30 分钟。

一、样本处理:

1. 样品的诱导前处理: 将 NR 诱导剂 (50 \times) 用蒸馏水稀释 50 倍, 如取 49ml 蒸馏水加入 1ml 诱导剂。将植物样品浸泡于诱导剂中, 浸泡 2 小时。

注: 如未经诱导, 植物体内 NR 活性很低, 预测定结果没有活性 ($\text{OD}_{\text{测定管}} < \text{OD}_{\text{对照管}}$) 则需要诱导处理。

二、硝酸还原酶提取:

1. 即用型 NR 提取缓冲液配制:

	一个反应配制体积 1ml	n 个反应配制体积 n \times 1ml
试剂 2-NR 提取缓冲液 (2 \times)	0.5ml	n \times 0.5ml
1M DTT (100 \times)	10 μl	n \times 10 μl
灭菌水	0.49ml	n \times 0.49ml



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

注：配制好的即用型 NR 提取缓冲液可以 4°C 短期保存一周。

2. NR 提取步骤

取诱导后的样品或新鲜植物组织，清洗干净，擦干，液氮中研磨，1cm² 叶片（1 分硬币大小）或 0.1g 叶片粉末加入 1ml 即用型 NR 提取缓冲液，颠倒混匀，12000rpm 4°C 离心 5 分钟，上清即为 NR 提取液，冰浴放置备用。

注：NR 提取液最好立即测定，不建议保存。

三、硝酸根还原步骤：

1. 即用型标准液配制：

取试剂 7-标准液（100×）稀释 100 倍，即取 10μl 加 990μl 灭菌水中，混匀，即用型标准液浓度为 0.1μmol/ml（100μM）。

2. 即用型 NADH 配制：

根据标签所示加入超纯水配制试剂 4-NADH（10×），稀释 10 倍，如取 100μl 加 900μl 灭菌水，混匀，冰浴备用。

3. 参考下表设置检测反应体系，按照顺序在 1.5ml 离心管中依次加入试剂（单位μl）：

加入顺序		1#测定管	2#对照管	3#标准管	4#空白管
1	NR 提取液（样本）	100	100	-	-
2	即用型标准液 0.1μmol/ml(100μM)	-	-	100	-
3	蒸馏水	-	125	-	125
4	试剂 3-NR 分析缓冲液	375	375	375	375
5	即用型 NADH	125	-	125	-
6	30 度水浴 0.5 小时				
7	试剂 5-显色液 1	250	250	250	250
8	试剂 6-显色液 2	250	250	250	250
9	混匀，常温显色 0.5 小时				

计算：

1. 用蒸馏水调零分光光度计，取 1ml 加到比色皿中，分别测定各管在 540nm 的吸光值，记录读数。

NR 单位定义（Units）：每小时每克鲜重样品中催化产生 1μmol NO₂⁻ 的量为一个 NR 活力单位。

NR 活性（μmol/h/g FW）=（测定 OD-对照 OD）/（标准 OD-空白 OD）×标准品浓度（0.1μmol/ml）×（取样体积 0.1ml）/（样品鲜重 g×反应时间 0.5h）×样品测定前稀释倍数（如 0.1g 叶片用 1ml 提取缓冲液，即稀释 10 倍）

此公式整理为：NR 活性（μmol/h/g FW）=0.2/FW×（测定 OD-对照 OD）/（标准 OD-空白 OD）

2. 计算举例：

0.1 克植物鲜重材料使用 1ml 提取缓冲液提取：稀释倍数为 10

测定 OD=0.159 对照 OD=0.121 标准 OD=0.16 空白 OD=0.004

NR 活性（μmol/h/g FW）=0.2/0.1×（0.159-0.121）/（0.16-0.004）=0.012

有效期：试剂盒常温运输；按照标签温度贮存；开封使用后有效期一年。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com