

硝酸还原酶 (NR) 活性检测试剂盒 (Griess显色法) (微量法)

产品货号: BA1872

产品规格: 100管/48样

产品简介:

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540nm处有吸收峰, 540nm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。

产品组成:

试剂名称	规格	保存条件
诱导剂储备液	液体100mL×1瓶	2-8℃
提取液	液体60mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体5mL×1瓶	-20℃
试剂二	粉剂×2支	-20℃
试剂三	液体6mL×1瓶	2-8℃
试剂四	液体6mL×1瓶	2-8℃
标准品	液体1mL×1支	2-8℃

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10mL诱导剂储备液加90mL蒸馏水, 充分混匀。现配现用。
2. 试剂二: 加入1mL蒸馏水, -20℃分装保存, 可以-20℃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。

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, 一般不需要诱导处理, 预实验结果没有活性则需要诱导处理)。

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

2. 细胞或细菌的前处理:



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

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/酶标仪预热30min以上，调节波长至540nm，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℃(哺乳动物)或25℃(其他物种)反应30min				
试剂三	50	50	50	50
试剂四	50	50	50	50
混匀，室温显色20min，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

(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 mg 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 μmol/mL；V 提取：加入提取液体积，1mL；W：样本质量，g；T：反应时间，0.5h；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；V 样本：加入的样本体积，0.02mL；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 0.1g 绿萝叶片加入 1mL 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 × (A 测定 - A 对照) ÷ (A 标准 - A 空白) ÷ W = 0.0721 U/g 质量。
2. 取 0.1g 洋桔梗叶片加入 1mL 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 × (A 测定 - A 对照) ÷ (A 标准 - A 空白) ÷ W = 0.216 U/g 质量。



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