

硝酸还原酶 (Nitrate Reductase, NR) 活性测定

试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 样

测定意义

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。

测定原理

NR 催化硝酸盐还原为亚硝酸盐, $\text{NO}_3^- + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$; 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。

需自备的仪器和用品

可见分光光度计、水浴锅、台式离心机、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

诱导剂储备液: 液体 50mL×1 瓶, 4℃ 保存。

提取液: 液体 50mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂一: 液体 10mL×1 瓶, -20℃ 保存。

试剂二: 液体 8mL×1 瓶, -20℃ 保存。

试剂三: 液体 15mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂四: 液体 15mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂五: 标准储备液 1mL, -20℃ 保存。

诱导剂应用液的配制: 用时将诱导剂储备液稀释 10 倍, 即取 10mL 诱导剂储备液加 90mL 蒸馏水, 充分混匀。

0.1umol/mL 的标准液的配制: 用时将试剂五稀释 100 倍, 即取 0.1ml 试剂五加 9.9mL 蒸馏水, 充分混匀。

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、称取约 0.1g 样本, 加入 1mL 提取液, 冰浴研磨, 4000g, 4℃ 离心 10min, 取上清置冰上待测。

测定步骤

- 1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 540nm，蒸馏水调零。
- 2、样本测定（在 EP 管中加入下列试剂）

试剂名称（ μL ）	加样孔			
	测定管	对照管	标准管	空白管
样本	100	100		
0.1 $\mu\text{mol/mL NaNO}_2$			100	
双蒸水		500		100
试剂一	375		375	375
试剂二	125		125	125
混匀后，37 $^{\circ}\text{C}$ （哺乳动物）或 25 $^{\circ}\text{C}$ （其它物种）水浴 30min				
试剂三	250	250	250	250
试剂四	250	250	250	250

混匀，显色 20min，4000g 常温离心 10min，取上清，540nm 下比色

注意：标准管和空白管只需测一次。

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。

$$\text{NR (U/g 鲜重)} = \frac{C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div (W \div V \text{ 样总}) \div T}{=0.2 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W}$$

（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。

$$\text{NR (U/g prot)} = \frac{C \text{ 标准管} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}}{\div T} = 0.2 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

C 标准管：标准管浓度，0.1 $\mu\text{mol/mL}$ ；V 样总：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；