硝酸还原酶(NR)检测试剂盒(离体微板法)

产品简介:

硝酸还原酶(Nitrate reductase，NR)是一种氧化还原酶，可分为参与硝酸盐同化的同化型还原酶和催化以硝酸盐为活体氧化的最终电子受休的硝酸盐呼吸异化型(呼吸型)还原酶。硝酸还原酶是植物氮素代谢中氮素同化的关键酶，该酶与作物吸收利用氮肥有关，对作物的产量和质量有影响，因此可以把硝酸还原酶的活力当作营养诊断、农田施肥或作物育种的生理生化指标。硝酸还原酶(NR)测定方法可分为活体法和离体法，活体法步骤简，适合快速、多组测定；离体法比较复杂，但重复性好。

硝酸还原酶(NR)检测试剂盒(离体微板法)检测原理是硝酸还原酶催化硝酸盐还原为亚硝酸盐，其反应如下：$NO_3^-+NADH+H^+ \rightarrow NO_2^-+NAD^++H_2O$，产生的亚硝酸盐与磺胺及萘胺在酸性条件下定量生成稳定的红色偶氮化合物，于酶标仪 520nm 处检测吸光度，由产生的亚硝态氮的量表示硝酸还原酶的活性，一般以单位μg/(g•h)表示，主要用于检测植物样本、血清等中硝酸还原酶活性，尤其适用于离体植物组织硝酸还原酶的活力。该试剂盒仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

编号 / 名称	GCTE0501 100T	Storage
试剂(A): 亚硝态氮标准(100μg/ml)	1ml	4℃
试剂(B): NR Lysis Buffer	250ml	4℃
试剂(C): NR Assay Buffer	30ml	RT
试剂(D): 硝酸盐缓冲液	15ml	RT
试剂(E): NADH	2 支	-20℃
试剂(F): NR 终止液	15ml	RT 避光
试剂(G): 萘胺显色液	15ml	RT 避光
使用说明书	1 份	

自备材料:

1、蒸馏水

2、恒温箱或水浴锅、离心管或试管、低温离心机、匀浆器或研钵、酶标仪、96 孔板

操作步骤(仅供参考):

1、准备样品:

①植物样品：取 0.25g 植物组织(根系)清洗干净，切碎，置于-20℃冰箱 30min，按植物组织：NR Lysis Buffer=0.25g：2ml 的比例，加入预冷的 NR Lysis Buffer，冰浴情况下充分匀浆或研磨，4℃ 4000r/min 离心 15~20min，留取上清液即为硝酸还原酶粗提液，4℃保存待用。

②血浆、血清和尿液样品：血浆、血清按照常规方法制备后可以直接用于该试剂盒的测定，-20℃冻存，用于硝酸还原酶的测定。

③高活性样品：如果样品中含有较高活性的硝酸还原酶，可以使用 NR Lysis Buffer 进行恰当的稀释。

2、稀释系列亚硝态氮标准并制作标准曲线：取适量的亚硝态氮标准(100μg/ml)，按亚硝态氮标准(100μg/ml)：蒸馏水=1：99 的比例混合，即获得亚硝态氮标准(1μg/ml)，然后按下表进行稀释并加入相关试剂。

加入物(μl)	0	1	2	3	4	5	6
亚硝态氮标准(1μg/ml)	0	20	40	80	120	160	200
蒸馏水	200	180	160	120	80	40	0
NR 终止液	100	100	100	100	100	100	100
萘胺显色液	100	100	100	100	100	100	100
亚硝态氮含量(μg)	0	0.02	0.04	0.08	0.12	0.16	0.2

按上表加入试剂后混匀，25℃水浴孵育 30min，以 0 号管为空白调零，比色杯光径 1.0cm，以分光光度计测定 520nm 处系列标准管(1~6 号)吸光度，以 1~6 号亚硝态氮含量(μg)为横坐标，以对应的吸光度为纵坐标，绘制亚硝态氮标准曲线。

3、配制 NADH 工作液：取 1 支 NADH 恢复至室温，完全溶解于 10ml NR Assay Buffer，即得 NADH 工作液；4℃预冷备用，-20℃保存 1 周有效。注意：NADH 易失效，该试剂盒多送 1 支 NADH 备用。

4、NR 加样：按照下表设置对照管、测定管，溶液应按照顺序依次加入，如果样品中的酶活性过高，可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定，样品的检测最好能设置平行管。

加入物(μl)	对照管	测定管
NR Assay Buffer	40	—
待测样品(硝酸还原酶粗提液)	—	40
硝酸盐缓冲液	120	120
NADH 工作液	40	40
混匀，25℃孵育 30min，立即加入 NR 终止液。		
NR 终止液	100	100
萘胺显色液	100	100
混匀，显色 30min，4℃ 4000r/min 离心 15min。		

5、 NR 测定：离心后取 200μl 上清液，以对照调零，酶标仪测定 520nm 处测定管的吸光度。

计算：

以亚硝态氮含量(1~6 号)为横坐标，以对应的吸光度为纵坐标，绘制亚硝态氮标准曲线，根据亚硝态氮含量与吸光度关系直接计算回归方程，根据回归方程计算出反应体系中亚硝态氮含量。按下公式计算样品中的 NR 活性：

$$NR[\mu g/(g \cdot h)]=X\times V_1/(W\times t\times V_2)$$

式中：X=根据标准曲线计算出酶粗提液中亚硝态氮含量(μg)/2

V_1=提取酶液时加入的缓冲液体积(μl)=2000

W=植物新鲜重量(g)

t=孵育时间(h)=0.5

V_2=加样时加入的提取酶液体积(μl)=40

注意事项：

1、 取植物样本，最好在晴天进行，提前一天施硝态氮肥，取样部位应一致。

2、 加入 NADH 工作液后应在避光条件下进行，以防亚硝酸盐还原为氨。

3、 显色和比色时间应一致，显色时间过长或过短对颜色都有影响。

4、 如果没有酶标仪，也可以使用普通的分光光度计测定。

5、 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

6、 试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

有效期：6 个月有效。低温运输，按要求保存。

相关产品：

产品编号	产品名称
GCCS0001	ACK 红细胞裂解液(ACK Lysis Buffer)
GCDA0001	DAPI 染色液(5ug/ml)
GCDC0032	Masson 三色染色液
GCPT0001	BCA 蛋白定量试剂盒
GCTC0713	葡萄糖检测试剂盒(GOD-POD 比色法)
GCTO1023	植物丙二醛(MDA)检测试剂盒(TBA 比色法)
GCTP1023	植物根系活力检测试剂盒(TTC 比色法)