硝酸还原酶(NR)检测试剂盒(活体微板法)

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(活体微板法)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 520~540nm 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中硝酸还原酶活性。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	GCTE0505 100T	Storage
试剂(A): 亚硝态氮标准(100μg/ml)	1ml	4℃
试剂(B): NR Assay Buffer	50ml	RT
试剂(C): NR 终止液	10ml	RT 避光
试剂(D): 磺胺显色液	8ml	RT 避光
试剂(E): 萘胺显色液	8ml	RT 避光
使用说明书	1 份	

自备材料:

1、 无氨蒸馏水或去离子水

2、 电子天平、剪刀或钻孔器、真空泵(或注射器)、真空干燥器

3、 离心管、试管、烧杯或三角瓶、恒温箱或水浴锅、玻璃瓶塞、酶标仪、96 孔板

操作步骤(仅供参考):

1、 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	15	30	60	90	120	150
蒸馏水	150	135	120	90	60	30	0
磺胺显色液	75	75	75	75	75	75	75
萘胺显色液	75	75	75	75	75	75	75
亚硝态氮含量(μg)	0	0.015	0.03	0.06	0.09	0.12	0.15
亚硝态氮浓度(μg/ml)	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1

按上表加入试剂后混匀，25℃孵育 30min，以 0 号孔为空白调零，酶标仪测定 520nm 处系列标准孔(1~6 号)吸光度，以 1~6 号亚硝态氮含量(μg)或浓度(μg/ml)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。

2、准备样品：

①取 0.2g~0.5g 新鲜植物组织 2 份，清洗干净，剪成 1×1cm 的小块状，分别放入两个烧杯(或三角瓶)中，再向其中一个烧杯中加入 0.1ml NR 终止液、0.45ml 去离子水和 0.45ml NR Assay Buffer 作为对照杯，向另一个烧杯中加入 0.45ml 去离子水和 0.45ml NR Assay Buffer 作为测定杯。

②将烧杯置于真空干燥器中，真空泵抽气减压 1min，再通入空气，反复几次，以排除组织间隙的气体，直至叶片完全软化沉于杯底。也可以用 5ml 注射器代替真空干燥装置，即将叶片和试剂一起倒入注射器内，用手指堵住出口孔，然后用力拉注射器使之成为真空，如此抽气放气反复多次，即可抽去叶片中的空气，并沉于溶液中。

③将烧杯或注射器置于 30℃温箱或水浴锅中避光反应 30min，向测定杯中加入 0.1ml NR 终止液终止酶反应；各杯摇匀后静置 2min，取 150μl 反应液待测。

3、NR 加样：按照下表设置对照孔、测定孔，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孔。

加入物(μl)	对照孔	测定孔
反应液	150	150
磺胺显色液	75	75
萘胺显色液	75	75

加入各成分后摇匀，显色 30min，4℃ 4000r/min 离心 15min。

4、NR 测定：离心后取上清液，对照孔调零，酶标仪测定 520nm 处测定孔的吸光度。

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：

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

式中：X=根据标准曲线计算出酶粗提液中亚硝态氮含量(μg)

C=根据标准曲线计算出酶粗提液中亚硝态氮浓度(μg/ml)

V_1=提取酶液时加入的缓冲液总体积(ml)=1=0.1+0.45+0.45

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(ml)=0.15

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、 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。

3、 如果没有分光光度计，也可以使用普通的酶标仪测定。

4、 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

5、 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。室温运输，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)

