

硝酸还原酶（NR）检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AMHA8-C24	硝酸还原酶(NR)试剂盒	24T	常量法
AMHA8-C48		48T	

一、测定意义：

硝酸还原酶广泛存在于植物中，是植物氮素同化的限速酶，可直接调节硝酸盐还原，从而调节氮代谢，并影响到光合碳代谢，其活性水平与植物体内多种代谢过程和生理指标有关。

二、测定原理：

硝酸还原酶催化硝酸盐还原为亚硝酸盐，在酸性条件下，产生的 NO_2^- 能够参与重氮化反应生成红色偶氮化合物，该物质在波长 540 nm 处有吸收峰，测定其吸光度值的变化来计算硝酸还原酶的活性。

三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量 (24T)	试剂装量 (48T)	保存条件
诱导剂储备液	液体 30 mL×1 瓶	液体 50 mL×1 瓶	2~8℃保存
诱导剂应用液 的配制：用时将诱导剂储备液用蒸馏水稀释 10 倍，充分混匀。			
提取液	液体 30mL×1 瓶	液体 60mL×1 瓶	2~8℃保存
试剂一	液体 15mL×1 瓶	液体 25mL×1 瓶	2~8℃保存
试剂二	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	2~8℃保存
试剂二 的配制：每支粉剂加入蒸馏水 1mL，充分溶解，-20℃保存。临用前用蒸馏水将试剂二稀释 100 倍，备用，即取 10 μL 试剂二加入 990 μL 蒸馏水混匀。			
试剂三	液体 15mL×1 瓶	液体 25mL×1 瓶	2~8℃保存
试剂四	液体 15mL×1 瓶	液体 25mL×1 瓶	2~8℃保存
标准品 (10μmol/mL)	液体 1mL×1 支	液体 1mL×1 支	2~8℃保存
标准品 的配制：将标准品用蒸馏水 100 倍稀释得到 0.1μmol/mL 标准液，现用现配。			

四、操作步骤：

样本前处理

- 1、取适量**诱导应用液**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 2 h，取出样本，滤纸吸干后，-20℃冷冻 30 min，取出样本，滤纸吸干。
- 2、组织提取液的制备：按照组织质量 (g) :提取液(mL)为 1:10 的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆。5000 rpm，4℃离心 10 min，取上清置冰上待测；
- 3、细菌/细胞：按照细胞数量(10^4 个) :提取液体积 (mL) 为 500~1000:1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 200W，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 5min）；然后 10000g，4℃离心 10min，取上清置于冰上待测；
- 4、血清（浆）等液体样本：直接测定。若有浑浊请离心后取上清待测。

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、试剂回复至常温；
- 3、操作表（在离心管中加入以下试剂）：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管	空白管
样本 (μL)	100	100	-	-
0.1μmol/mL 标准品 (μL)	-	-	100	-
蒸馏水 (μL)	-	400	-	100
试剂一 (μL)	400	-	400	400
试剂二 (μL)	100	100	100	100
混匀后，37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）水浴 30min				
试剂三 (μL)	200	200	200	200
试剂四 (μL)	200	200	200	200
混匀，25℃室温静置 20min，540nm 下比色，记为 $A_{\text{测定}}$ ， $A_{\text{对照}}$ ， $A_{\text{标准}}$ ， $A_{\text{空白}}$ ，计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。				

每个样本需设置一个对照，标准和空白只需做 1-2 管。

五、硝酸还原酶(NR)活性计算：

1、血清样本 NR 计算

单位定义：每小时每毫升血清每分钟催化产生 $1\mu\text{mol NO}^2$ 的量为一个 NR 活力单位。

计算公式： $\text{NR (U/mL)} = \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \div T = 0.2 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}}$

2、组织、细胞样本 NR 计算

(1) 按样本质量计算：

单位定义：每小时每 g 鲜重样中催化产生 $1\mu\text{mol NO}^2$ 的量为一个 NR 活力单位。

计算公式： $\text{NR (U/g)} = \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times W) \div T = 0.2 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W$

(2) 按蛋白浓度计算：

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。

计算公式： $\text{NR (U/mg Cpr)} = \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 0.2 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div \text{Cpr}$

(3) 按照细菌或细胞数量计算：

单位定义：每小时每 1 百万个细菌或细胞催化产生 $1\mu\text{mol NO}^2$ 的量为一个 NR 活力单位。

计算公式： $\text{NR (U/10}^6 \text{ cell)} = \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times 5) \div T = \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}}$

$C_{\text{标准}} = 0.1\mu\text{mol/mL}$ ； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.1mL； $V_{\text{提取}}$ ：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，30 min=0.5h；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量 g，5：细胞/细菌数，500 万。

六、注意事项：

1、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进行诱导处理。

2、样本活性比较低的时候，可以适当增加样本的取样量或者增加样本提取浓度。

3、本反应显色 1h 较为稳定，在此时间内比色较好。

【厂家信息】

生产企业：南京陌凡生物科技有限公司

地址：南京市栖霞区红枫科技园 A6 栋 2 层

【售后微信】



【说明书核准及修改日期】

核准日期：2025 年 4 月 7 日

修改日期：2025 年 4 月 7 日