

硝酸还原酶（NR）活性检测试剂盒（Griess 显色法）说明书

可见分光光度法

货号：BC4960

规格：50T/24S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
诱导剂储备液	液体 50 mL×1 瓶	2-8℃保存
提取液	液体 30mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 12 mL×1 瓶	-20℃保存
试剂二	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂三	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃保存

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 10 mL 诱导剂储备液加 90 mL 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、试剂三：若该试剂有析出，可 40℃溶解使用。
- 4、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。

产品说明：

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 540 nm 处有吸收峰，540 nm 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。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、水浴锅/培养箱、台式离心机、1 mL 玻璃比色皿、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，具体比例可以参考文献）

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 2 h，取出样本，滤纸吸干后，-20℃冷冻 30 min，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 0.1 g 样本, 加入 1 mL 提取液), 冰浴研磨, 8000g, 4℃离心 10 min, 取上清置冰上待测。

2、细胞或细菌的前处理:

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、可见分光光度计预热30 min以上, 调节波长至540 nm, 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	100	100	-	-
0.1 μmol/mL标准溶液	-	-	100	-
蒸馏水	-	375	-	475
试剂一	375	-	375	-
试剂二	125	125	125	125
混匀, 37℃(哺乳动物)或25℃(其他物种)反应30 min				
试剂三	250	250	250	250
试剂四	250	250	250	250
混匀, 室温显色20 min后测定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 g 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, 1 mL; W: 样本质量, g; T: 反应时间, 0.5 h; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; V 样本: 加入的样本体积, 0.1 mL; 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 0.8 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 0.1 g 绿萝叶片加入 1 mL 提取液进行匀浆研磨，离心取上清按照测定步骤操作，测得 A 测定=0.072、A 对照=0.051、A 标准=0.363、A 空白=0.005，按样本质量计算酶活得：
NR 活力 (U/g 质量) = $0.2 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 对照}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W = 0.117 \text{ U/g 质量}$ 。
2. 取 0.1 g 洋桔梗叶片加入 1 mL 提取液进行匀浆研磨，离心取上清按照测定步骤操作，测得 A 测定=0.063、A 对照=0.032、A 标准=0.363、A 空白=0.005，按样本质量计算酶活得：
NR 活力 (U/g 质量) = $0.2 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 对照}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W = 0.173 \text{ U/g 质量}$ 。

相关发表文献：

- [1] Liu G, Rui L, Yang Y, Liu R, Li H, Ye F, You C, Zhang S. Identification and Functional Characterization of MdNRT1.1 in Nitrogen Utilization and Abiotic Stress Tolerance in *Malus domestica*. *Int J Mol Sci*. 2023 May 26;24(11):9291. doi: 10.3390/ijms24119291. PMID: 37298242; PMCID: PMC10252592.
- [2] Huang Y, Chen J, Jiang Q, Huang N, Ding X, Peng L, Deng X. The molybdate-binding protein ModA is required for *Proteus mirabilis*-induced UTI. *Front Microbiol*. 2023 Apr 27; 14:1156273. doi: 10.3389/fmicb.2023.1156273. PMID: 37180242; PMCID: PMC10174112.
- [3] Chen W, Liu J, Chu G, Wang Q, Zhang Y, Gao C, Gao M. Comparative evaluation of four *Chlorella* species treating mariculture wastewater under different photoperiods: Nitrogen removal performance, enzyme activity, and antioxidant response. *Bioresour Technol*. 2023 Oct; 386:129511. doi: 10.1016/j.biortech.2023.129511. Epub 2023 Jul 17. PMID: 37468008.
- [4] Shen C, Li Q, An Y, Zhou Y, Zhang Y, He F, Chen L, Liu C, Mao W, Wang X, Liang H, Yin W, Xia X. The transcription factor GNC optimizes nitrogen use efficiency and growth by up-regulating the expression of nitrate uptake and assimilation genes in poplar. *J Exp Bot*. 2022 Aug 11;73(14):4778-4792. doi: 10.1093/jxb/erac190. PMID: 35526197.
- [5] Wang Y, Lu Y, Wang L, Song G, Ni L, Xu M, Nie C, Li B, Bai Y. Analysis of the molecular composition of humic substances and their effects on physiological metabolism in maize based on untargeted metabolomics. *Front Plant Sci*. 2023 May 22; 14:1122621. doi: 10.3389/fpls.2023.1122621. PMID: 37284724; PMCID: PMC10239833.

相关系列产品：

- BC0070/BC0075 谷氨酸合成酶 (GOGAT) 活性检测试剂盒
BC0910/BC0915 谷氨酰胺合成酶 (GS) 活性检测试剂盒
BC1500/BC1505 植物硝态氮含量检测试剂盒
BC1520/BC1525 植物氨态氮含量检测试剂盒

