硝酸还原酶（NR）活性检测试剂盒说明书（NADH 速率法）

规格：96 样　　方法：酶标仪法

一、注意事项

1. 使用前请通读一遍说明书再开始实验。
2. 正式检测前选取 2~3 个样本进行预检测。
3. 本试剂盒仅用于科研。
4. 建议使用新鲜没有冷冻过的样本。
5. 一般不要诱导处理，预测定结果没有活性（ΔA≤0）则需要诱导处理。

二、产品组分

试剂名称	试剂规格	保存条件	备注
诱导剂储备液	50 mL×1	4℃	诱导剂应用液的配制：用时将诱导剂储备液稀释 10 倍，即取 10 mL 诱导剂储备液加 90 mL 蒸馏水，充分混匀。
提取液	120 mL×1	4℃	
试剂一	10 mL×1	-20℃	
试剂二	粉剂×2	-20℃	临用前每瓶加 2 mL 提取液溶解，现配现用。

三、仪器和用品

酶标仪、96 孔板、移液器、天平、可降温离心机、超纯水/蒸馏水、研磨仪/研钵、冰、水浴锅。

四、样品制备

1. 组织：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 2 h，取出样本，滤纸吸干。按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液），进行冰浴匀浆。8000 g，4℃离心 10 min，取上清，置冰上待测。

2. 细菌/细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌/细胞数量（10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次）；8000 g，4℃离心 10 min，取上清，置冰上待测。

五、测定步骤

1.酶标仪预热 30 min 以上，波长调至 340 nm 处。

2.在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	空白管
上清液	10	-
提取液	-	10
试剂一	75	75
超纯水/蒸馏水	90	90
试剂二	25	25
充分混匀后，记录 1 min 时吸光值 A1 和 6 min 时吸光值 A2，ΔA 测定=A1 测定-A2 测定，ΔA 空白=A1 空白-A2 空白。空白管只需做 2~3 管。		

六、计算

1. 按照样本质量计算

按样本鲜重计算：单位定义：每 min 每 g 鲜重样品中催化减少 1 nmol NADH 的量为一个 NR 活力单位。

NR（nmol/min/g 鲜重）=（ΔA 测定-ΔA 空白）÷（ε×d）×10^9×V 反总÷（W×V 样÷V 样总）÷T=1071.67×ΔA÷W。

2. 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每 min 每 mg 组织蛋白催化减少 1 nmolNADH 的量为一个 NR 活力单位。

NR（nmol/min/mg prot）=（ΔA 测定-ΔA 空白）÷（ε×d）×10^9×V 反总÷（V 样×Cpr）÷T=1071.67×ΔA÷Cpr。

V 反总：反应体系总体积，0.2 mL；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L/mol/cm；d：96 孔板光径，0.6 cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g。

七、产品简介

硝酸还原酶（NR）是植物氮同化的关键酶，催化硝酸盐还原为亚硝酸盐，在氮素转化利用中发挥重要作用，是评价植物氮代谢效率的重要指标。