

## 植物铵态氮含量试剂盒说明书

(货号: G0410W 微板法 96 样)

### 一、产品简介:

氮素是构成生物体的一种必需元素,自然界中的氮素循环包括许多转化作用。空气中的氮气被固氮微生物及植物与微生物的共生体固定成氨态氮,经过硝化微生物的作用转化成硝态氮,后者被植物或微生物同化成有机氮化物,植物组织氨氮含量可反映植物受胁迫的程度。

$\alpha$ -氨基酸与水合茚三酮溶液一起加热,经氧化脱氨变成相应的 $\alpha$ -酮酸,酮酸进一步脱羧变成醛,水合茚三酮则被还原,在弱酸环境中,还原型茚三酮,氨和另一分子水合茚三酮反应,缩合生成蓝紫色物质,在 570nm 处有特征吸收峰。

### 二、测试盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 110mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂×4 瓶	4°C保存	临用前加入 1.5mL 无水乙醇,盖紧后充分混匀,再加入 13.5mL 试剂一混匀,10 天内用完。
试剂三	粉剂×3 支	4°C保存	用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部,每支再加 1.5 mL 蒸馏水充分溶解,用不完的试剂分装后-20°C保存(可保存一个月),禁止反复冻融,解冻后可 4°C保存并一周内使用完。
标准品	液体×1 支	4°C保存	若重新做标曲,则用到该试剂。

[注]: 粉剂量在 mg 级别,使用前用手甩几次或者进行离心,打开直接加入要求的试剂即可。

### 三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、水浴锅、可调式移液枪、研钵、无水乙醇、冰和蒸馏水。

### 四、植物铵态氮含量的测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

#### 1、样本制备:

##### ① 组织样本:

称取约 0.1g 组织,加入 1mL 提取液,进行室温匀浆,12000rpm,4°C离心 10min,上清液置冰上待测。

[注]:也可按照组织质量(g)提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

##### ② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液;超声波破碎细菌或细胞(冰浴,300W,超声 3s,间隔 7s,总时间 3min);12000rpm,4°C离心 10min,取上清,置冰上待测。

[注]:若增加样本量,按照细菌/细胞数量( $10^4$ 个):提取液体积(mL)为 500~1000: 1 的比例进行提取。

##### ③ 液体样本:直接检测;若浑浊,离心后取上清检测。

#### 2、上机检测:

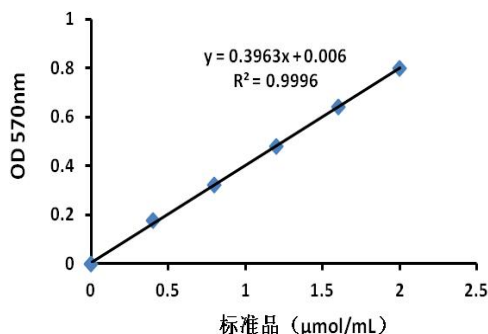
##### ① 酶标仪预热 30 min,调节波长到 570 nm。

##### ② 在 EP 管中按照下表依次加入试剂:

试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (只做一次)
蒸馏水		40
上清液	40	
试剂二	560	560
试剂三	40	40
混匀, 盖紧盖 (可用封口膜缠绕, 防止水分散失), 置于沸水浴中 15 min, 再冷水迅速冷却,		
95%乙醇	320	320
混匀, 取 200μL 澄清液体 (若浑浊可 8000rpm 室温离心 5min) 于 96 孔板中, 在 570nm 读取吸光值 A, ΔA=A 测定-A 空白。		

## 五、结果计算:

1、标准曲线方程:  $y = 0.3963x + 0.006$ ; x 是标准品摩尔浓度(μmol/mL), y 是ΔA。



2、按样本质量计算:

$$\begin{aligned} \text{铵态氮含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) &= [(\Delta A - 0.006) \div 0.3963 \times V1] \div (V1 \div V \times W) \\ &= 2.52 \times (\Delta A - 0.006) \div W \end{aligned}$$

3、按细胞数量计算:

$$\begin{aligned} \text{铵态氮含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.006) \div 0.3963 \times V1] \div (V1 \div V \times 500) \\ &= 2.52 \times (\Delta A - 0.006) \div 500 \end{aligned}$$

4、按照液体体积计算:

$$\text{铵态氮含量}(\mu\text{mol/mL}) = [(\Delta A - 0.006) \div 0.3963 \times V1] \div V1 = 2.52 \times (\Delta A - 0.006)$$

V---样品提取液总体积, 1mL;      V1---加入样本体积, 0.04 mL;

500---细胞数量, 百万;              W---样品质量, g。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 标准品母液 (10μmol/mL);
- 2 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.μmol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线。