

植物中酰胺含量测定试剂盒说明书

(货号: G0172F 分光法 24 样)

一、产品简介:

酰胺(尿囊酸和尿囊素)是大豆一根瘤菌共生固氮中的氮代谢产物,是氮素贮藏和运输的主要形式,在大豆氮代谢中起着重要作用。可通过测定豆科植物组织中酰胺的含量,从而评估其固氮能力。

尿囊素在过酸或碱条件下水解产生乙醛酸,然后在苯肼和强酸条件下可被氧化,生成红色络合物,在 535 nm 处有特殊吸收峰,据此可由吸光值计算出样本中酰胺的含量。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 4.2mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 4.2mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 4.2mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	粉体 mg×4 支	-20°C保存	用前甩几下使试剂落入底部,每支再加 1.8mL 蒸馏水溶解备用,避光保存。
试剂五	空瓶×1 瓶	4°C保存	浓盐酸(自备)
试剂六	粉体 mg×4 支	4°C保存	用前甩几下使试剂落入底部,每支再加 1.8mL 蒸馏水溶解备用,避光保存。
标准品	粉体 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、超声机、离心机、可调式移液器、研钵、冰、金属浴、浓盐酸。

四、酰胺含量测定:

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 组织样本(粉末状干样可取 0.05g),加入 1.5mL 提取液,冰浴匀浆;在 80°C金属浴萃取 5min,冷却至室温,12000rpm,25°C离心 10min;取上清液待检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 535nm。

② 试剂五和试剂六使用前请先置于冰上预冷 30min 左右。

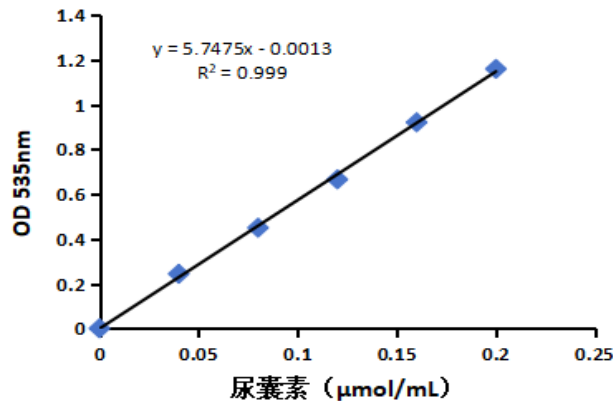
③ 在 EP 管中依次加入:

试剂名称(μL)	对照管	尿囊酸测定管	酰胺测定管
样本	210	210	210
试剂一	70		70
试剂二	70		70
试剂三		140	
			混匀,95°C金属浴加热 7min,冷却至室温

试剂四	70	70	70
混匀，室温静置 6min，，冷却至 4℃			
试剂五	350	350	350
试剂六	70	70	70
混匀，室温静置 15min 后，取全部澄清液体至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 535nm 读值。ΔA 尿囊酸=A 尿囊酸管-A 对照管，ΔA 酰脲=A 酰脲管-A 对照管。			

五、结果计算：

1、标准曲线方程为 $y = 5.7475x - 0.0013$ ；x 为标准品浓度（ $\mu\text{mol/mL}$ ），y 为 ΔA 。



2、按样本质量计算：

$$\text{尿囊酸含量}(\mu\text{mol/g}) = [(\Delta A \text{ 尿囊酸} + 0.0013) \div 5.7475 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times D$$

$$= 0.261 \times (\Delta A \text{ 尿囊酸} + 0.0013) \div W \times D$$

$$\text{酰脲含量}(\mu\text{mol/g}) = [(\Delta A \text{ 酰脲} + 0.0013) \div 0.0057 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times D$$

$$= 0.261 \times (\Delta A \text{ 酰脲} + 0.0013) \div W \times D$$

V---加入提取液体积，1.5 mL；

V1---加入样本体积，0.21mL；

W---样本质量，g；

D---稀释倍数，未稀释即是 1。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（ $0.2\mu\text{mol/mL}$ ）：用前加 1mL 蒸馏水混匀溶解即 2mg/mL 的标准品，再用蒸馏水稀释 60 倍后得到 $0.2\mu\text{mol/mL}$ 标准品母液。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0,0.04,0.08,0.12,0.16,0.2. $\mu\text{mol/mL}$ 。
- 3 依据酰脲测定管的加样表操作（把样本换成各个浓度标准品），根据结果即可制作标准曲线。