

植物硝态氮试剂盒说明书

(货号: BP10357W 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

硝态氮是植物最主要的氮源。植物体内硝态氮含量反映了土壤中硝态氮的供应情况, 可作为土壤氮肥的指标。测定植物体内的硝态氮含量, 不仅能够反映出植物的氮素营养情况, 而且对鉴定蔬菜和以植物为原料的加工制品的品质也有重要的意义。

在浓酸条件下, NO_3^- 与水杨酸反应, 生成硝基水杨酸, 硝基水杨酸在强碱条件下呈黄色, 该黄色物质在 410nm 处有最大光吸收, 通过比色测定进而计算得植物硝态氮含量。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	粉剂×4 支	4℃避光保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 每支再加 1.3mL 浓硫酸充分溶解, 4℃避光保存 1 周。
试剂二	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	自备		1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

【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、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、**浓硫酸**、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

① 组织样本: 称取约 0.1g, 加入 1mL 蒸馏水, 室温匀浆后, 置于沸水浴中浸提 30min (期间不断晃动), 待冷却后于 25℃, 12000rpm 离心 15min, 取上清待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 蒸馏水体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本: 先收集细菌/细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌或细胞加入 1mL 蒸馏水; 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次), 置于沸水浴中浸提 30min (期间不断晃动), 待冷却后于 25℃, 12000rpm 离心 15min, 取上清待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 比例提取。

③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、检测步骤:

① 打开酶标仪, 调节波长至 410nm。在 EP 管中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
样本	10	

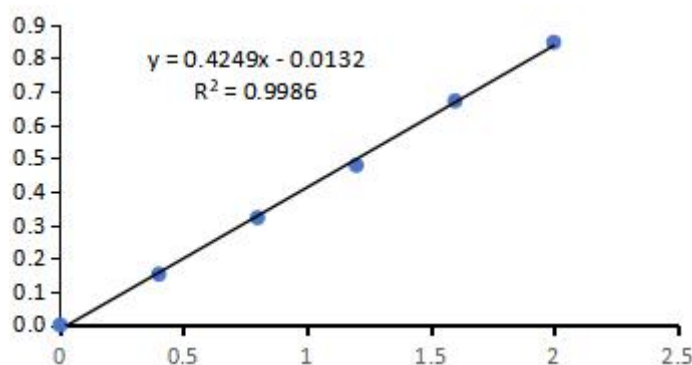
蒸馏水		10
试剂一	40	40
室温(25°C)反应 10min		
试剂二 (沿着管壁务必缓慢加入)	950	950
混匀, 取 200μL 于 96 孔板中, 410nm 处读取吸光值 A, ΔA=A 测定管-A 空白管。		

【注】1.试剂一和试剂二含有强酸强碱物质, 需做好实验防护措施, 谨慎操作!

2.若ΔA 值小于 0.01, 则可以增加样本加样量 V1 (如增至 40μL, 则试剂二相应减少), 或增加取样质量 W 或细菌/细胞数量。则改变后的 V1 和 W 和数量需带入公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.4249x - 0.0132$; x 为标准品质量 (μg), y 为吸光值ΔA。



2、按样本质量计算:

$$\begin{aligned} \text{硝态氮}(\text{NO}_3\text{-N}) \text{ 含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0132) \div 0.4249] \div (W \times V1 \div V) \\ &= 235.3 \times (\Delta A + 0.0132) \div W \end{aligned}$$

3、按样本蛋白浓度计算:

$$\begin{aligned} \text{硝态氮}(\text{NO}_3\text{-N}) \text{ 含量}(\mu\text{g/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0132) \div 0.4249] \div (\text{Cpr} \times V1 \div V) \\ &= 235.3 \times (\Delta A + 0.0132) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算:

$$\begin{aligned} \text{硝态氮}(\text{NO}_3\text{-N}) \text{ 含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0132) \div 0.4249] \div (500 \times V1 \div V) \\ &= 0.471 \times (\Delta A + 0.0132) \end{aligned}$$

5、按照液体体积计算:

$$\text{硝态氮}(\text{NO}_3\text{-N}) \text{ 含量}(\mu\text{g/mL}) = [(\Delta A + 0.0132) \div 0.4249] \div V1 = 235.3 \times (\Delta A + 0.0132)$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---样本的加样体积, 10μL=0.01mL;

500---细胞数量, 万;

W---样本质量, g;

Cpr---蛋白浓度 (mg/mL); 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

1 称量 3.61mg 的硝酸钾入 EP 管中, 再加 1mL 蒸馏水充分溶解 (母液需在两天内用且 -20°C 保存), 标准品母液浓度为 500μg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 40, 80, 120, 160, 200. μg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下:

吸取标准品母液 400uL，加入 600uL 蒸馏水，混匀得到 200ug/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μg/mL	0	40	80	120	160	200
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	10	
蒸馏水		10
试剂一	40	40
室温(25℃)反应 10min		
试剂二 (沿着管壁务必缓慢加入)	950	950
混匀，取 200μL 于 96 孔板中，410nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		