

植物铵态氮含量试剂盒说明书

(货号: BP10112W-96 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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。

α -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 α -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、测成和配

试剂盒组制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 110mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂一	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 4 瓶	4℃保存	每瓶: 1. 临用前加入 1.5mL 无水乙醇, 盖紧后充分混匀; 2. 再加入 13.5mL 试剂一混匀, 10 天内用完。
试剂三	粉剂 3 支	4℃保存	每支: 1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使试剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 每支再加 1.5 mL 蒸馏水充分溶解, 用不完的试剂分装后-20℃保存(可保存一个月), 禁止反复冻融, 解冻后可 4℃保存并一周内使用完。
标准品	液体 1.5mL×1 支	4℃避光保存	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、无水乙醇、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 组织, 加入 1mL 提取液, 进行室温匀浆, 12000rpm, 4℃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℃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（10⁴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、检测步骤：

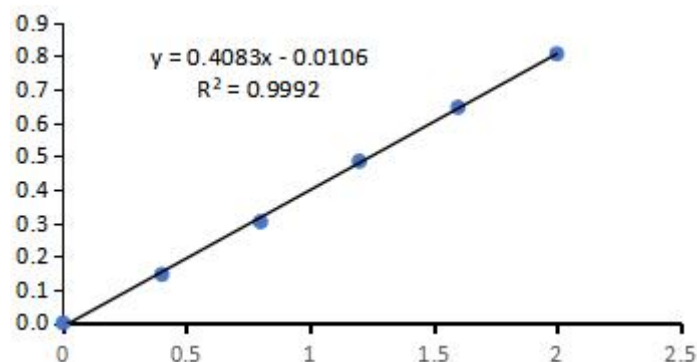
① 酶标仪预热 30 min，调节波长到 570 nm。

② 在 EP 管中按照下表依次加入试剂：

试剂组分 (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， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.4083x - 0.0106$ ；x 是标准品摩尔浓度(μmol/mL)，y 是 ΔA 。



2、按样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{铵态氮含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0106) \div 0.4083 \times V_1] \div (V_1 \div V \times W) \\ &= 2.44 \times (\Delta A + 0.0106) \div W \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{NH}_4^+ \text{含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0106) \div 0.4083 \times V_1] \div (V_1 \div V \times W) \times 18 \\ &= 44.09 \times (\Delta A + 0.0106) \div W \end{aligned}$$

3、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{铵态氮含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0106) \div 0.4083 \times V_1] \div (V_1 \div V \times 500) \\ &= 2.44 \times (\Delta A + 0.0106) \div 500 \end{aligned}$$

$$\text{NH}_4^+\text{含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell})=[(\Delta A+0.0106) \div 0.4083 \times V_1] \div (V_1 \div V \times 500) \times 18$$

$$=44.09 \times (\Delta A+0.0106) \div 500$$

4、按照液体体积计算：

$$\text{铵态氮含量}(\mu\text{mol}/\text{mL})=[(\Delta A+0.0106) \div 0.4083 \times V_1] \div V_1=2.44 \times (\Delta A+0.0106)$$

$$\text{NH}_4^+\text{含量}(\mu\text{g}/\text{mL})=[(\Delta A+0.0106) \div 0.4083 \times V_1] \div V_1 \times 18=44.09 \times (\Delta A+0.0106)$$

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 标准品母液浓度为 10 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2. $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。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 200 μL ，加入 800 μL 蒸馏水，混匀得到 2 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 的标品稀释液待用。						
标品浓度 $\mu\text{mol}/\text{mL}$	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2
标品稀释液 μL	0	40	80	120	160	200
水 μL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据测定管加样表操作，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	40	
蒸馏水		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 200 μL 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， $\Delta A=A$ 测定-0 浓度管。		