

植物铵态氮含量试剂盒说明书

(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。

α -氨基酸与水合茛三酮溶液一起加热，经氧化脱氨变成相应的 α -酮酸，酮酸进一步脱羧变成醛，水合茛三酮则被还原，在弱酸环境中，还原型茛三酮，氨和另一分子水合茛三酮反应，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℃保存	
试剂一	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×4 瓶	4℃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×1 支	4℃保存	临用前加 4.5mL 蒸馏水，充分溶解。
标准品	液体×1 支	4℃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℃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 (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。

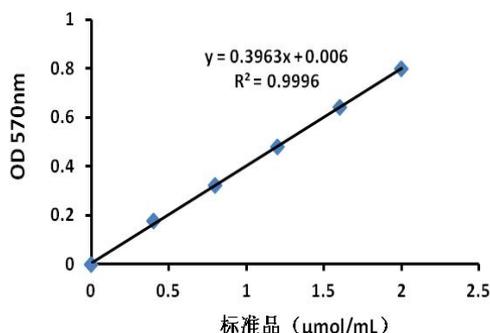
② 在 EP 管中按照下表依次加入试剂：

试剂名称 (μ L)	测定管	空白管 (只做一次)
蒸馏水		40
上清液	40	
反应 mix	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 μ L 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 - 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($\mu\text{mol/mL}$)，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（10 $\mu\text{mol/mL}$ ）；
- 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, 2.0 $\mu\text{mol/mL}$ 。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。