

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0757

Size: 50T/48S

植物铵态氮检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义：

氮素是构成生物体的一种必需元素。铵态氮进入植物细胞后形成氨基酸或酰胺，植物组织氮含量可反映植物受胁迫的程度。

二、测定原理：

氨基酸的 α -氨基可与水合茚三酮反应，产生蓝紫色化合物，在 570 nm 有特征吸收峰；通过测定 570 nm 吸光度，来计算氨基酸含量。

三、需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、1mL 玻璃比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器、无水乙醇、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 60mL × 1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉剂 × 1 瓶	4℃ 保存	临用前将试剂三倒入使其充分溶解备用。该试剂溶解后 10 天内有效。
试剂二	粉剂 × 2 瓶	4℃ 避光保存	临用前加 2mL 蒸馏水充分溶解
试剂三	液体 45mL × 1 瓶	4℃ 保存	
标准品	粉剂 × 1 支	4℃ 避光保存	10mg 胱氨酸，临用前加入 1.157mL 提取液，得到 1000 μ g/mL 氮标准液。

五、操作步骤：

1. 粗酶液提取：

按照质量 (g) 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g, 加入 1mL 提取液) 加入提取液, 室温匀浆后于 25°C, 12000g 离心 10min, 取上清待测。

2. 测定步骤：

1) 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 570nm, 蒸馏水调零。

2) 将 1000 $\mu\text{g/mL}$ 氮标准液用提取液分别稀释为 200、100、50、25、12.5 $\mu\text{g/mL}$ 。

3) 操作表：

试剂名称 (μL)	测定管	标准管	空白管
样本	50	—	—
标准品	—	50	—
蒸馏水	—	—	50
试剂一	500	500	500
无水乙醇	500	500	500
试剂二	50	50	50

混匀后盖紧瓶盖封口膜封口 (防止水分散失) 置于沸水浴中保温 10 min, 冷却后反复颠倒 EP 管数次, 将测定管 8000rpm 离心 5min 后取上清, 于 570nm 测定吸光值。显色后务必在 30min 内测完。计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$, $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。

六、植物氨态氮含量计算：

1、标准曲线的绘制

以各个氮标准液为横坐标，其对应的 ΔA 标准为纵坐标，建立标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 带入方程中，得到 x ($\mu\text{g/mL}$)

2、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量的计算

按样本鲜重计算

$\text{NH}_3\text{-N}$ 含量 ($\mu\text{g/g FW}$) = $x \times V_{\text{提取}} \div W = x \div W$ 。

按蛋白浓度计算

$\text{NH}_3\text{-N}$ 含量 ($\mu\text{g/mg prot}$) = $x \times V_{\text{提取}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{提取}}) = x \div \text{Cpr}$ 。

W: 样品质量, g; Cpr: 蛋白浓度, mg/mL ; $V_{\text{提取}}$: 样品提取液总体积, 1mL。

七、注意事项：

为保证实验结果的准确性，需先取 1-2 个样做预实验，如果测定的吸光值过高（高于 1）用提取液稀释后再测定。