

植物氨态氮含量检测试剂盒说明书

微量法

货号: AC10328

规格: 100T/96S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 120 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	粉剂×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×2 瓶	4°C保存
试剂三	液体 22 mL×1 瓶	4°C保存
标准品	粉剂×1 支	4°C保存

溶液的配制:

- 1、试剂一: 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。
- 2、试剂二: 临用前加 1 mL 蒸馏水充分溶解。
- 3、标准品: 10 mg 半胱氨酸, 临用前加入 1.157 mL 提取液, 得到 1000 µg/mL 氮标准液。

产品说明:

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

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570nm有特征吸收峰; 通过测定570nm吸光度, 来计算氨基酸含量。

技术指标:

最低检出限: 24.2 µg/mL

线性范围: 25-400 µg/mL

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、微量玻璃比色皿/96孔板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、无水乙醇、冰和蒸馏水。

操作步骤:**一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)**

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。

二、测定步骤

1. 分光光度计/酶标仪预热30min以上, 调节波长至570nm, 分光光度计蒸馏水调零。
2. 将1000µg/mL氮标准液用提取液分别稀释为400、300、200、100、50、25 µg/mL。

3. 操作表:

试剂名称 (μL)	测定管	标准管	空白管
样本	15	-	-
标准品	-	15	-
提取液	-	-	15
试剂一	150	150	150
无水乙醇	150	150	150
试剂二	15	15	15

充分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 10min，冷却后反复颠倒 EP 管数次，将测定管 8000rpm 离心 5min 后取上清，吸取 200μL 于微量玻璃比色皿或者 96 孔板中，于 570nm 测定吸光值。显色后务必在 30min 内测完。计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。

三、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 (μg/mL)。

2. NH₃-N含量的计算:

(1) 按样本质量计算: $\text{NH}_3\text{-N含量} (\mu\text{g/g 质量}) = x \times V_{\text{提取}} \div W = x \div W$

(2) 按蛋白浓度计算: $\text{NH}_3\text{-N含量} (\mu\text{g/mg prot}) = x \times V_{\text{提取}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{提取}}) = x \div C_{\text{pr}}$

W: 样本质量, g; C_{pr}: 蛋白浓度, mg/mL; V_{提取}: 样本提取液总体积, 1mL。

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，如果测定吸光值超过线性范围吸光值，可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。

相关发表文献:

[1] Fuyuan Zhu, Moxian Chen, Wailung Chan, et al. SWATH-MS quantitative proteomic investigation of nitrogen starvation in Arabidopsis reveals new aspects of plant nitrogen stress responses. Journal of Proteomics. September 2018; (IF3.537)