（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K858-M

产品规格：48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器：酶标仪(405-415 nm)

Elabscience®植物硝态氮比色法测试盒

Plant Nitrate Nitrogen Colorimetric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测植物组织或土壤样本中硝态氮的含量。

检测原理

硝态氮在强酸性环境中可与水杨酸反应生成硝基水杨酸。硝基水杨酸在强碱性条件下呈黄色，在 410 nm 波长下颜色的深浅与含量成正比。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	显色剂 1 (Chromogenic Agent 1)	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃避光保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	显色剂 2 (Chromogenic Agent 2)	60 mL×1 瓶	60 mL×2 瓶	2-8℃避光保存 6 个月
	96 孔酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。对于粉剂，使用前请先离心，以免造成试剂损失。

所需自备物品

仪器：酶标仪(405-415 nm，最佳检测波长 410 nm)、涡旋混匀仪、恒温水浴锅、离心机

耗材：枪头(1000 μL，200 μL，10 μL)、EP 管(1.5 mL)

试剂：硝酸钾、浓硫酸

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至25℃。

② 反应液的配制：

取一瓶试剂一加入2.4 mL浓硫酸，充分混匀，静置至液体澄清透亮。未使用完的溶液可在4℃避光保存一周。

③ 500 μg/mL标准品的配制：

称取3.61 mg硝酸钾试剂，加入1 mL双蒸水，未使用的溶液-20℃避光可保存一周。

④ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(μg/mL)	**0**	**10**	**20**	**40**	**80**	**120**	**160**	**200**
500 μg/mL 标准品(μL)	0	10	20	40	80	120	160	200
双蒸水(μL)	500	490	480	460	420	380	340	300

样本准备

① 样本处理

组织样本：按照样本质量(g): 双蒸水体积 (mL) =1: 4的比例 (如称取0.1 g的组织样本，加入0.4 mL的双蒸水) 进行匀浆处理。匀浆后置于沸水浴中浸提30 min，然后将样本置于流水中冲洗，待样本冷却至室温，10000 × g离心15 min，取上清，置于冰上待用。

土壤样本：新鲜土壤样本自然风干或37℃烘箱风干，过30~50目筛。按照土壤质量(g)：双蒸水体积 (mL) = 1: 4 的比例，每 0.1 g 土壤样本加入 0.4 mL 双蒸水，进行匀浆。10000 × g 离心 15 min，取上清，置于冰盒中待用。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：1.09-200 μg/mL，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
20%绿萝根组织	不稀释	20%土壤	不稀释
20%玉米叶组织	不稀释	20%青椒组织	不稀释

注：稀释液为双蒸水。

实验关键点

① 确保反应液充分混匀。

② 反应液黏度很高，取用时要仔细缓慢。

③ 反应液和试剂二都为强腐蚀性液体，操作时请注意防护。

操作步骤

① 标准管：取 10 μL 不同浓度标准品，加入到对应的标准管中；
样本管：取 10 μL 待测样本，加入到样本管中。

② 向①中各管加入 50 μL 反应液。

③ 充分混匀，室温静置 3 min。

④ 向步骤③中各管加入 950 μL 试剂二。

⑤ 充分混匀，从 EP 管中取出 200 μL 溶液加到酶标板孔中，在酶标仪 410 nm 处测定各孔 OD 值。

操作表

	标准管	**样本管**
不同浓度标准品(μL)	10	--
待测样本(μL)	--	10
反应液(μL)	50	50
充分混匀，室温静置 3 min		
试剂二(μL)	950	950
充分混匀，从 EP 管中取出 200 μL 溶液加到酶标板孔中，在酶标仪 410 nm 处测定各孔 OD 值。		

结果计算

标准品拟合曲线：y = ax+ b

组织样本中硝态氮含量的计算公式：

$$\text{硝态氮含量}\ (\mu g/g) = (\Delta A - b) \div a \times V \div m \times f$$

注解：

y：标准品 OD 值-空白孔 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x：硝态氮浓度，μg/mL

a：标曲斜率

b：标曲截距

ΔA：样本孔 OD 值-空白孔 OD 值

m：组织湿重或土壤质量，建议 m 取 0.1 g

V：样本处理过程中加入双蒸水的体积，建议 V 取 0.4 mL

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

附录1 关键数据

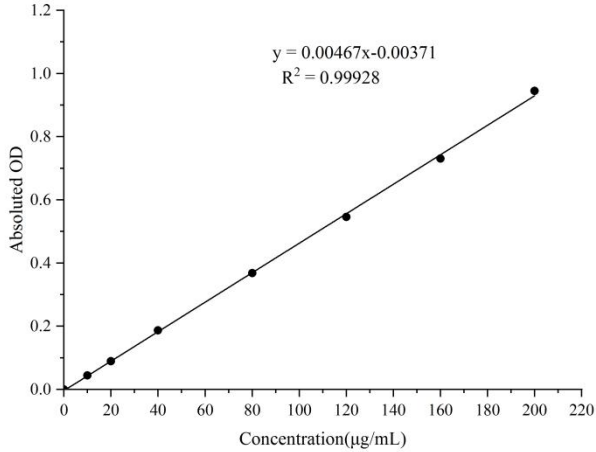
1. 技术参数

检测范围	1.09-200 μg/mL	平均批间差	3.2-5.1%
灵敏度	1.09 μg/mL	平均批内差	1.5-4.3%
平均回收率	96%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量10 μL，按照操作步骤进行实验，测得各浓度标准品OD值如下表所示：

标准品浓度 (μg/mL)	0	10	20	40	80	120	160	200
OD 值	0.045	0.089	0.135	0.229	0.420	0.599	0.775	0.994
	0.047	0.091	0.135	0.236	0.408	0.584	0.779	0.988
平均 OD 值	0.046	0.090	0.135	0.233	0.414	0.592	0.777	0.991
绝对 OD 值	0.000	0.044	0.089	0.187	0.368	0.546	0.731	0.945



②按上表数据绘制标准曲线，如下图所示：

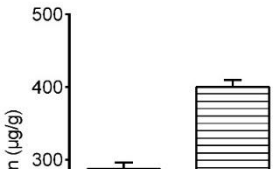
附录2 实例分析

例如检测绿萝根组织(数据仅供参考)：

剪碎绿萝根组织样本，称取0.1 g组织样本，加入0.5 mL双蒸水，常规匀浆处理，匀浆后置于沸水浴中浸提30 min，然后将样本置于流水中冲洗，待样本冷却至室温，10000 × g离心15 min，取上清待测。取10 μL样本进行检测，按操作表操作，结果如下：硝态氮的标准曲线：y = 0.0047x - 0.0037，测定孔OD值为0.310，空白孔OD值为0.046，计算结果为：

$$\text{硝态氮含量}\ (\mu g/g) = (0.310 - 0.046 + 0.0037) \div 0.0047 \times 0.4 \div 0.1 = 227.83\ \mu g/g$$

按照说明书操作，测定绿萝根（20%组织匀浆，加样量10 μL）、土壤（20%匀浆，加样量10 μL）、玉米叶（20%组织匀浆，加样量10 μL）、青椒（20%组织匀浆，加样量10 μL）中硝态氮含量（如下图）：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数，重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本，重新检测
样本测量结果过大	样本浓度太高	选择合适稀释倍数，重新检测
	样本杂质干扰	对样本进行除杂

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。