

(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](mailto:biochemical@elabscience.cn)

网址：[www.elabscience.cn](http://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	1 板		
	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  $\mu$ L，200  $\mu$ L，10  $\mu$ L)、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°C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  $\mu\text{L}$  不同浓度标准品，加入到对应的标准管中；  
样本管：取 10  $\mu\text{L}$  待测样本，加入到样本管中。
- ② 向①中各管加入 50  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  试剂二。
- ⑤ 充分混匀，从 EP 管中取出 200  $\mu\text{L}$  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( $\mu\text{L}$ )	10	--
待测样本( $\mu\text{L}$ )	--	10
反应液( $\mu\text{L}$ )	50	50
充分混匀，室温静置 3 min		
试剂二( $\mu\text{L}$ )	950	950
充分混匀，从 EP 管中取出 200 $\mu\text{L}$ 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：

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

( $\mu\text{g/g}$ )

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， $\mu\text{g/mL}$

a：标曲斜率

b：标曲截距

$\Delta A$ ：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

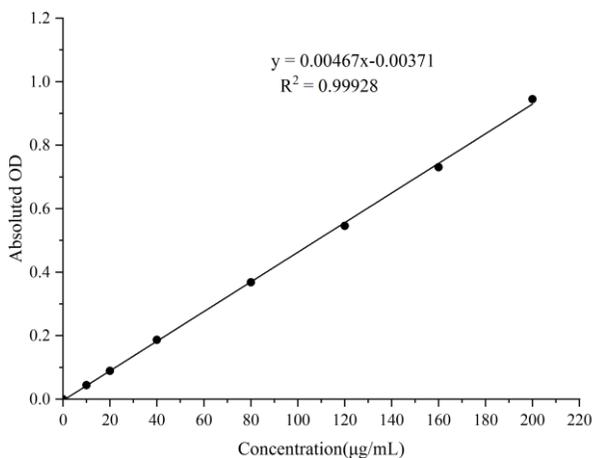
检测范围	1.09-200 $\mu\text{g/mL}$	平均批间差	3.2-5.1%
灵敏度	1.09 $\mu\text{g/mL}$	平均批内差	1.5-4.3%
平均回收率	96%		

### 2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量10  $\mu\text{L}$ ，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 ( $\mu\text{g/mL}$ )	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：



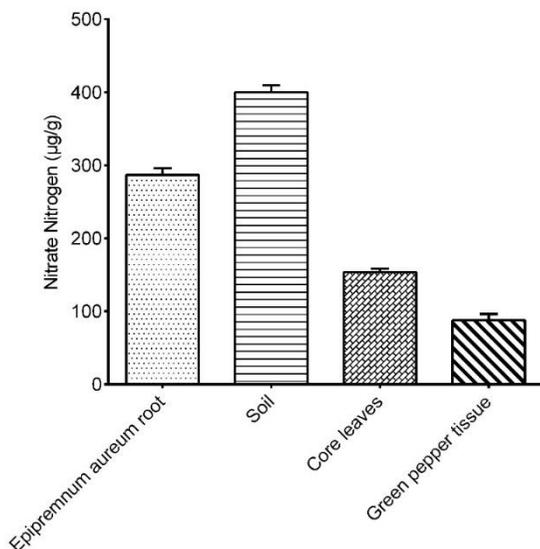
## 附录2 实例分析

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:

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

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。





