

(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-K859-M

产品规格: 48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器: 酶标仪(615-635nm)

Elabscience®植物铵态氮比色法测试盒

Plant Ammonium 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中铵态氮含量。

检测原理

铵态氮在强碱性介质中与次氯酸盐和酚类物质作用，生成水溶性染料靛酚蓝，在 625nm 处有特征吸收峰，吸光值与铵态氮含量成正比。

本试剂盒检测组织样本时，可测定总蛋白浓度，推荐使用本公司考马斯亮蓝法 (货号 E-BC-K168-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size 1)(48 T)	规格 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extracting Solution)	55 mL×1 瓶	55 mL×2 瓶	2-8℃ 避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	显色剂 A (Chromogenic Agent A)	7.5 mL×1 瓶	15 mL×1 瓶	2-8℃ 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	显色剂 B (Chromogenic Agent B)	7.5 mL×1 瓶	15 mL×1 瓶	2-8℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent4)	5 mmol/L 标准品 (5 mmol/L Standard)	1 mL×1 支	1 mL×1 支	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。

所需自备物品

仪器：酶标仪（615-635 nm，最适检测波长 625 nm）

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至25℃。

② 1 mmol/L标准品的配制：

按照试剂一：试剂四=4: 1的比例稀释，充分混匀，按需配制，现用现配。

③ 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(mmol/L)	0.00	0.10	0.20	0.30	0.40	0.60	0.80	1.00
1 mmol/L 标准品(μ L)	0	50	100	150	200	300	400	500
试剂一(μ L)	500	450	400	350	300	200	100	0

样本准备

① 样本处理

按照样本质量 (g) : 试剂一体积 (mL) =1: 9的比例 (如称取0.1 g的组织样本，加入0.9 mL的试剂一) 向样本中加入试剂一，机械匀浆处理后，12000 \times g，4℃离心10 min，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

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：0.046-1 mmol/L，不同样本的稀释如下表 (仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%绿萝根组织	不稀释	10%南瓜组织	不稀释
10%玉米叶组织	不稀释	10%青椒组织	不稀释

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

实验器具必须干净，避免引入污染。

操作步骤

- ① 标准孔：取 20 μL 不同浓度标准品，加入到对应的标准孔中；
测定孔：取 20 μL 待测样本，加入到测定孔中。
- ② 向①中各孔加入 120 μL 试剂二。
- ③ 向②中各孔加入 120 μL 试剂三。
- ④ 酶标仪上振板 10 s，25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min，酶标仪 625 nm 处测定各孔 OD 值。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度标准品 (μL)	20	--
待测样本 (μL)	--	20
试剂二 (μL)	120	120
试剂三 (μL)	120	120
振板 10s，25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min，酶标仪 625 nm 测定各孔 OD 值。		

本试剂盒检测组织样本时，可测定总蛋白浓度，推荐使用本公司考马斯亮蓝法(货号：E-BC-K168-M)。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

组织样本(以组织湿重进行计算):

$$\begin{aligned} \text{铵态氮含量} \\ (\mu\text{g/g}) \end{aligned} = (\Delta A - b) \div a \times V \div m \times f \times 14^*$$

组织样本(以组织蛋白进行计算):

$$\begin{aligned} \text{铵态氮含量} \\ (\mu\text{g/mgprot}) \end{aligned} = (\Delta A - b) \div a \div C_{\text{pr}} \times f \times 14^*$$

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: 吸光度对应的浓度

a: 标曲斜率

b: 标曲截距

ΔA : 样本测定 OD 值-空白孔 OD 值

m: 组织湿重, 建议 m 取 0.1 g

V: 植物组织处理过程中加入试剂一的体积, 建议 V 取 0.9 mL

C_{pr} : 待测样本蛋白浓度(mgprot/mL)

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

14*: 氮的微摩尔质量 14 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$

附录1 关键数据

1. 技术参数

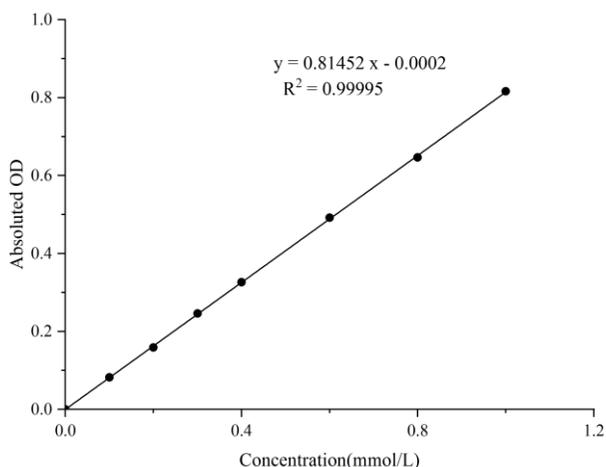
检测范围	0.046-1 mmol/L	批间差	1.6-4.9%
灵敏度	0.046 mmol/L	批内差	1.4-3.9%
回收率	94-98%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品，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 (mmol/L)	0.00	0.10	0.20	0.30	0.40	0.60	0.80	1.00
OD 值	0.044	0.128	0.214	0.290	0.379	0.549	0.703	0.858
	0.043	0.126	0.210	0.286	0.371	0.530	0.689	0.836
平均 OD 值	0.044	0.127	0.212	0.288	0.375	0.540	0.696	0.847
绝对 OD 值	0.000	0.084	0.169	0.245	0.332	0.496	0.653	0.804

②按上表数据绘制标准曲线，如下图所示：



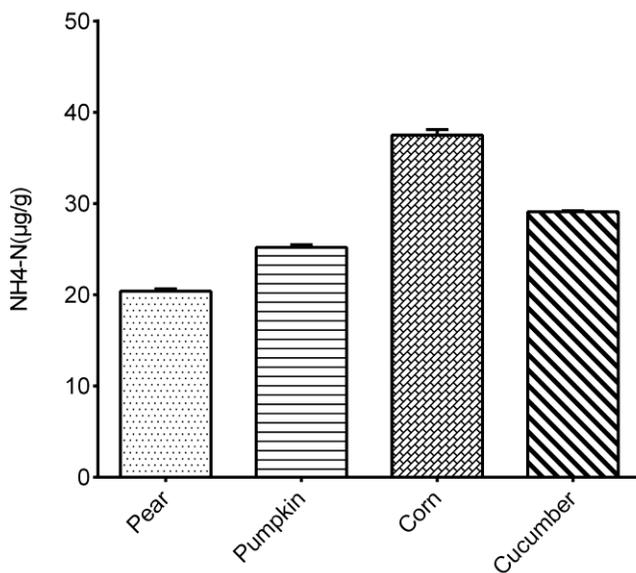
附录2 实例分析

例如检测青椒果肉组织(数据仅供参考):

取10%青椒组织匀浆液20 μL , 按操作表操作, 结果如下: 铵态氮的标准曲线: $y = 0.81452x - 0.0002$, 测定孔OD值为0.156, 空白孔OD值为0.044, 计算结果为:

$$\text{铵态氮含量} (\mu\text{g/g}) = (0.156 - 0.044 + 0.0002) \div 0.81452 \times 0.9 \div 0.1 \times 14 = 17.36 \mu\text{g/g}$$

按照说明书操作, 测定梨果肉(10%组织匀浆, 加样量20 μL)、南瓜果肉(10%组织匀浆, 加样量20 μL)、玉米果肉(10%组织匀浆, 加样量20 μL)、黄瓜果肉(10%组织匀浆, 加样量20 μL)中铵态氮含量($\mu\text{g/g}$)。(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

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。