

植物硝态氮试剂盒说明书

(微板法 96 样)

一、产品简介：

硝态氮是植物最主要的氮源。植物体内硝态氮含量反映了土壤中硝态氮的供应情况，可作为土壤氮肥的指标。测定植物体内的硝态氮含量，不仅能够反映出植物的氮素营养情况，而且对鉴定蔬菜和以植物为原料的加工制品的品质也有重要的意义。

在浓酸条件下， NO_3^- 与水杨酸反应，生成硝基水杨酸，硝基水杨酸在强碱条件下呈黄色，该黄色物质在 410nm 处有最大光吸收，通过比色测定进而计算得植物硝态氮含量。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉剂×4 支	4°C保存	使用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部，每支再加 1.3mL 浓硫酸充分溶解，4°C避光保存 1 周。
试剂二	液体 100mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	自备		若重新做标曲，则用到该试剂。

【注】：粉剂量在 mg 级别，使用前用手甩几次或者进行离心，打开直接加入要求的试剂即可。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、天平、常温离心机、水浴锅、可调式移液器、**浓硫酸**。

四、植物硝态氮含量测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：称取约 0.1g，加入 1mL 蒸馏水，室温匀浆后，置于沸水浴中浸提 30min（期间不断晃动），待冷却后于 25°C，12000rpm 离心 15min，取上清待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量 (g)：蒸馏水体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本：先收集细菌/细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 蒸馏水；超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次），置于沸水浴中浸提 30min（期间不断晃动），待冷却后于 25°C，12000rpm 离心 15min，取上清待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量 (10^4 个)：提取液体积 (mL) 为 500~1000：1 比例提取。

③ 液体样本：直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测：

① 打开酶标仪，调节波长至 410nm。在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
样本	10	
蒸馏水		10
试剂一	40	40
室温(25°C)反应 10min		
试剂二 (沿着管壁务必缓慢加入)	950	950
混匀，取 200μL 于 96 孔板中，410nm 处读取吸光值 A，		

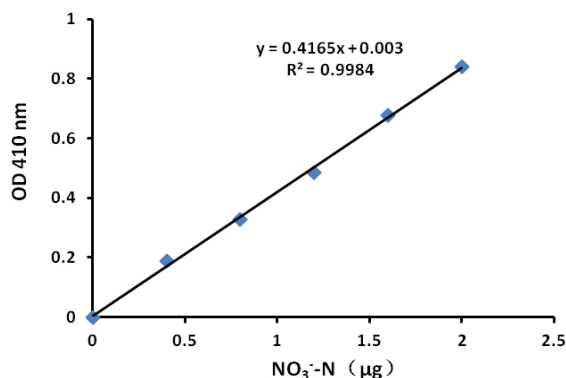
$\Delta A = A$ 测定管-A 空白管。

【注】1.试剂一和试剂二含有强酸强碱物质，需做好实验防护措施，谨慎操作！

2.若 ΔA 值小于 0.01，则可以增加样本加样量 V_1 （如增至 $40\mu\text{L}$ ，则试剂二相应减少），或增加取样质量 W 或细菌/细胞数量。则改变后的 V_1 和 W 和数量需带入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.4165x + 0.003$ ； x 为标准品质量（ μg ）， y 为吸光值 ΔA 。



2、按样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{硝态氮}(\text{NO}_3\text{-N}) \text{ 含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) &= [(\Delta A - 0.003) \div 0.4165] \div (W \times V_1 \div V) \\ &= 240.1 \times (\Delta A - 0.003) \div W \end{aligned}$$

3、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{硝态氮}(\text{NO}_3\text{-N}) \text{ 含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.003) \div 0.4165] \div (500 \times V_1 \div V) \\ &= 0.48 \times (\Delta A - 0.003) \end{aligned}$$

4、按照液体体积计算：

$$\text{硝态氮}(\text{NO}_3\text{-N}) \text{ 含量}(\mu\text{g}/\text{mL}) = [(\Delta A - 0.003) \div 0.4165] \div V_1 = 240.1 \times (\Delta A - 0.003)$$

V ---加入提取液体积， 1mL ；

V_1 ---样本的加样体积， $10\mu\text{L} = 0.01\text{mL}$ ；

500 ---细胞数量，万；

W ---样本质量， g 。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（ $500\mu\text{g}/\text{mL}$ ）：称量 3.61mg 的硝酸钾入 EP 管中，再加 1mL 蒸馏水充分溶解（母液需在两天内用且 -20°C 保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 40, 80, 120, 160, 200. $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样顺序操作，根据结果即可制作标准曲线。