

## 植物铵态氮试剂盒说明书

微量法 100T/96S

**注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。**

### 测定意义

氮素是构成生物体的一种必需元素，自然界中的氮素循环包括许多转化作用。空气中的氮气被固氮微生物及植物与微生物的共生体固定成氨态氮，经过硝化微生物的作用转化成硝态氮，后者被植物或微生物同化成有机氮化物，植物组织氨氮含量可反映植物受胁迫的程度。

### 测定原理

$\alpha$ -氨基酸与水合茚三酮溶液一起加热，经氧化脱氨变成相应的 $\alpha$ -酮酸，酮酸进一步脱羧变成醛，水合茚三酮则被还原，在弱酸环境中，还原型茚三酮，氨和另一分子水合茚三酮反应，缩合生成蓝紫色物质，在 580nm 处有特征吸收峰。

### 自备实验用品及仪器

天平、研钵、常温离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、恒温水浴锅。

### 试剂组成和配制

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 9mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 避光保存。临用前加 1.5mL 蒸馏水充分溶解。

试剂三：液体 15mL×1 瓶，4℃ 保存。

### 样本处理

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℃，12000g 离心 10min，取上清待测。

### 测定操作表

	空白管	测定管
样本 (μL)		60
蒸馏水 (μL)	60	
试剂一 (μL)	90	90
试剂二 (μL)	15	15
充分混匀，沸水浴 5min 后自然冷却 10min		
试剂三 (μL)	150	150
充分混匀，取 200μL 于微量石英比色皿/96 孔板中测定 580nm 处吸光值 A， $\Delta A = A_{测定管} - A_{空白管}$		

**注意：空白管只需测定一次。**

### 计算公式

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线： $y = 0.1535x - 0.0279$ ， $R^2 = 0.9993$

$$\begin{aligned} \text{NH}_4^+-\text{N 含量} (\mu\text{g/g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.0279) \div 0.1535 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \\ &= 32.9 \times (\Delta A + 0.0279) \div W \end{aligned}$$

$V_{\text{反总}}$ ：反应总体积，0.315mL； $V_{\text{样}}$ ：反应体系中加入样本体积，0.06mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL， $W$ ：样本质量，g

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线： $y = 0.0768x - 0.0279$ ， $R^2 = 0.9993$

$$\text{NH}_4^+-\text{N 含量} (\mu\text{g/g 鲜重}) = (\Delta A + 0.0279) \div 0.0768 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \\ = 65.8 \times (\Delta A + 0.0279) \div W$$

V 反总：反应总体积，0.315mL；V 样：反应体系中加入样本体积，0.06mL；V 样总：加入提取液体积，1mL，W：样本质量，g

#### 注意事项

1. 提取好的待测液尽快测定，低温保存不得超过 24 小时。
2. 沸水浴时间不宜过长，否则会对测定结果有影响。
3. 显色后 20min 内完成测定。
4. 最低检出限为 18 $\mu\text{g/g}$ 。