

植物中酰胺含量测定试剂盒说明书

(货号: G0172W 微板法 48 样)

一、产品简介:

酰胺(尿囊酸和尿囊素)是大豆根瘤菌共生固氮中的氮代谢产物,是氮素贮藏和运输的主要形式,在大豆氮代谢中起着重要作用。可通过测定豆科植物组织中酰胺的含量,从而评估其固氮能力。

尿囊素在过酸或碱条件下水解产生乙醛酸,然后在苯肼和强酸条件下可被氧化,生成红色络合物,在 535 nm 处有特殊吸收峰,据此可由吸光值计算出样本中酰胺的含量。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 3mL×1 支	4℃保存	
试剂二	液体 3mL×1 支	4℃保存	
试剂三	液体 3mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉体 mg×3 支	-20℃保存	使用前甩几下使试剂落入底部,每支再加 1.6mL 蒸馏水溶解备用,避光保存。
试剂五	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	浓盐酸(自备)
试剂六	粉体 mg×3 支	4℃保存	使用前甩几下使试剂落入底部,每支再加 1.6mL 蒸馏水溶解备用,避光保存。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、超声机、离心机、可调式移液器、研钵、冰、金属浴、浓盐酸。

四、酰胺含量测定:

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 组织样本(粉末状干样可取 0.05g),加入 1.5mL 提取液,冰浴匀浆;在 80℃金属浴萃取 5min,冷却至室温,12000rpm,25℃离心 10min;取上清液待检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 535nm。

② 试剂五和试剂六使用前请先置于冰上预冷 30min 左右。

③ 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	对照管	尿囊酸测定管	酰胺测定管
样本	75	75	75
试剂一	25		25
			混匀,95℃金属浴加热 7min,冷却至室温
试剂二	25		25
试剂三		50	
		混匀,95℃金属浴加热 7min,冷却至室温	
试剂四	25	25	25

混匀，室温静置 6min，， 冷却至 4℃			
试剂五	125	125	125
试剂六	25	25	25
混匀，室温静置 15min 后，取 200μL 的澄清液体至 96 孔板中，于 535nm 读值。 ΔA 尿囊酸=A 尿囊酸管-A 对照管， ΔA 酰脲=A 酰脲管-A 对照管。			

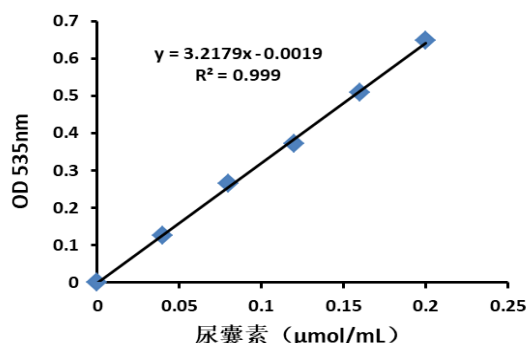
【注】1.对照管不进行水浴加热处理。

2.若 ΔA 值小于 0.01，可增加样本取样质量 W（如增至 0.2g）；则改变后的 W 需代入计算公式重新计算。

3.若 ΔA 高于 1.5 时，建议将样本用蒸馏水稀释后检测，则稀释倍数 D 带入公式计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程为 $y = 3.2179x - 0.0019$ ；x 为标准品浓度（ $\mu\text{mol/mL}$ ），y 为 ΔA 。



2、按样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{尿囊酸含量}(\mu\text{mol/g}) &= [(\Delta A \text{ 尿囊酸} + 0.0019) \div 3.21792 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.47 \times (\Delta A \text{ 尿囊酸} + 0.0019) \div W \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{酰脲含量}(\mu\text{mol/g}) &= [(\Delta A \text{ 酰脲} + 0.0019) \div 3.21792 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.47 \times (\Delta A \text{ 酰脲} + 0.0019) \div W \times D \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1.5 mL；

V1---加入样本体积，0.075mL；

W---样本质量，g；

D---稀释倍数，未稀释即是 1；

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（0.2 $\mu\text{mol/mL}$ ）：用前加 1mL 蒸馏水混匀溶解即 2mg/mL 的标准品，再用蒸馏水稀释 60 倍后得到 0.2 $\mu\text{mol/mL}$ 标准品母液。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0,0.04,0.08,0.12,0.16,0.2. $\mu\text{mol/mL}$ 。
- 3 依据酰脲测定管的加样表操作（把样本换成各个浓度标准品），根据结果即可制作标准曲线。