

## 植物中酰胺含量检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1880

产品规格：100管/48样

### 产品简介：

选育高固氮活性豆科植物品种是提高豆科植物固氮能力的一个有效途径。大豆根瘤菌固氮的最初输出产物主要是酰胺（尿囊素和尿囊酸）。酰胺是大豆一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535nm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。

**注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

### 产品组成：

| 试剂名称  | 规格            | 保存条件 |
|-------|---------------|------|
| 提取液A液 | 液体60mL×1瓶（自备） | 室温   |
| 提取液B液 | 液体60mL×1瓶     | 4℃   |
| 试剂一   | 液体2mL×1瓶      | 4℃   |
| 试剂二   | 液体2mL×1瓶      | 4℃   |
| 试剂三   | 液体2mL×1瓶      | 4℃   |
| 试剂四   | 液体4mL×1瓶      | 4℃   |
| 试剂五   | 粉剂×2瓶         | -20℃ |
| 试剂六   | 液体15mL×1瓶（自备） | 室温   |
| 试剂七   | 液体4mL×1瓶      | 4℃   |
| 标准品   | 粉剂×1支         | 4℃   |

### 溶液的配制：

1. 提取液A液：自备无水乙醇；
2. 试剂五：临用前取1瓶加入2mL蒸馏水溶解备用，可分装后-20℃保存，-20℃保存一周；
3. 试剂六：自备浓盐酸；
4. 标准品：10mg尿囊素。临用前加入632.5μL蒸馏水配制成100μmol/mL酰胺标准液。

### 需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅/恒温培养箱、鼓风烘箱、微量玻璃比色皿/96孔板、可调式移液枪、研钵、30~50目筛、冰和蒸馏水、EP管。

### 操作步骤：

#### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可参考文献）

植物样本：将供试的植物样本在65℃的鼓风烘箱中烘干，研磨成粉状，过30~50目筛。按质量（g）：提取液体积（mL）1：10~20比例（建议称取0.1g烘干样本，依次加入1.0mL提取液A与1.0mL提取液B，**禁止将提取液A与提取液B混匀待用**），漩涡混匀，在80℃水浴锅中萃取5min，然后3500rpm，室温，离心15min，弃沉淀，取上清液置于冰上待测。

#### 二、测定步骤

1. 分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至535nm，蒸馏水调零。
2. 将试剂六与试剂七置于冰水浴中预冷30min以上，并置于冰上待用。
3. 标准液的处理：将标准品配制成100μmol/mL的标准液后，用蒸馏水稀释至25、12.5、6.25、3.125、1.5625、0.78125nmol/mL的标准溶液备用。
4. 操作表：（在1.5mLEP管中操作）：



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

| 试剂名称                                                                                                                                                                                                                                                                             | 对照管 | 尿囊酸测定管                  | 酰脲测定管                 | 标准管 | 空白管 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-------------------------|-----------------------|-----|-----|
| 样本 (μL)                                                                                                                                                                                                                                                                          | 80  | 80                      | 80                    | -   | -   |
| 标准溶液 (μL)                                                                                                                                                                                                                                                                        | -   | -                       | -                     | 80  | -   |
| 蒸馏水 (μL)                                                                                                                                                                                                                                                                         | -   | -                       | -                     | -   | 80  |
| 试剂一 (μL)                                                                                                                                                                                                                                                                         | 10  | -                       | 10                    | 10  | 10  |
| 试剂三 (μL)                                                                                                                                                                                                                                                                         | -   | 20                      | -                     | -   | -   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                  | -   | -                       | 充分混匀, 沸水浴 7min, 冷却至室温 |     |     |
| 试剂二 (μL)                                                                                                                                                                                                                                                                         | 10  | -                       | 10                    | 10  | 10  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                  | -   | 充分混匀, 沸水浴加热 6min, 冷却至室温 |                       |     |     |
| 试剂四 (μL)                                                                                                                                                                                                                                                                         | 20  | 20                      | 20                    | 20  | 20  |
| 试剂五 (μL)                                                                                                                                                                                                                                                                         | 20  | 20                      | 20                    | 20  | 20  |
| 充分混匀, 室温下静置 6min, 然后转移至冰水浴中, 冷却至 4℃                                                                                                                                                                                                                                              |     |                         |                       |     |     |
| 试剂六 (μL)                                                                                                                                                                                                                                                                         | 100 | 100                     | 100                   | 100 | 100 |
| 试剂七 (μL)                                                                                                                                                                                                                                                                         | 20  | 20                      | 20                    | 20  | 20  |
| 充分混匀, 室温下静置 15min                                                                                                                                                                                                                                                                |     |                         |                       |     |     |
| 取 200 μL 反应液, 于微量玻璃比色皿/96 孔板中测定 535nm 处吸光值 A, 分别记为 A 对照管、A 尿囊酸测定管、A 酰脲测定管、A 标准管及 A 空白管。计算 $\Delta A_{\text{尿囊酸}} = A_{\text{尿囊酸测定管}} - A_{\text{对照管}}$ , $\Delta A_{\text{酰脲}} = A_{\text{酰脲测定管}} - A_{\text{对照管}}$ , $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。 |     |                         |                       |     |     |

**注意:** 对照管不进行水浴加热处理; 尿囊酸测定管只需进行第二次的沸水浴; 测定管、标准管及空白管在沸水浴加热时, EP 管盖紧并用封口膜密封, 避免液体蒸发影响试验数据。

### 三、植物中酰脲含量计算

#### 1. 标准曲线的绘制:

以各个标准溶液的浓度为 x 轴, 其对应的  $\Delta A$  标准为 y 轴, 绘制标准曲线, 得到标准方程  $y = kx + b$ , 将  $\Delta A_{\text{尿囊酸}}$  和  $\Delta A_{\text{酰脲}}$  分别带入方程得到  $x_1$  (nmol/mL) 和  $x_2$  (nmol/mL)。

#### 2. 豆科植物中酰脲含量的计算:

$$\text{尿囊酸含量 (nmol/g 质量)} = x_1 \times V_{\text{提取}} \div W = 2 \times x_1 \div W$$

$$\text{酰脲含量 (nmol/g 质量)} = x_2 \times V_{\text{提取}} \div W = 2 \times x_2 \div W$$

V 提取: 加入提取液体积, 2mL; W: 样本质量, g。

#### 注意事项:

1. 同一批检测样本需配 1-2 个空白管。
2. 当 OD 值高于 1.5 时, 建议将样本稀释后检测, 并在计算公式中乘以稀释倍数。
3. 试剂六与试剂七在使用之前请先置于冰上预冷 30min 以上。

#### 实验实例:

1. 取 0.1g 马齿苋, 进行样本处理, 按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测得计算  $\Delta A_{\text{酰脲}} = A_{\text{酰脲测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.332 - 0.226 = 0.106$ , 带入标准曲线  $y = 0.0548x - 0.024$ , 计算  $x_2 = 2.3723$ , 按照计算公式计算:

$$\text{酰脲含量 (nmol/g 质量)} = 2 \times x_2 \div W = 2 \times 2.3723 \div 0.1 = 47.446 \text{ nmol/g 质量。}$$



扫一扫 加微信

**郑州乐业生物科技有限公司**

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com