

## 植物总游离氨基酸含量检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
PYHB6-M48	植物总游离氨基酸含量检测试剂盒	48T	微量法
PYHB6-M48		96T	

### 一、测定意义：

氨基酸是组成蛋白质的基本单位，也是蛋白质的分解产物植物根系吸收、同化的氮素主要以氨基酸和酰胺的形式进行运输，所以测定植物组织中不同时期、不同部位游离氨基酸的含量，对于研究根系生理、氮素代谢等有一定的意义。

### 二、测定原理：

氨基酸的游离氨基与水合茚三酮作用后产生二酮茚-二酮茚胺的取代盐等蓝紫色化合物，在一定范围内颜色的深浅与氨基酸的含量成正比。

### 三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(48T)	试剂装量(96T)	保存条件
提取液	液体 60mL×1 瓶	液体 110mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 75mL×2 瓶	液体 100×2 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 18mL×1 瓶	液体 36mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂三	粉剂 ×1 支	粉剂 ×2 支	2-8°C保存
每瓶加 2ml 蒸馏水，现用现配。			
含氮量 50mg/L 标准品	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	2-8°C保存
含氮量 50mg/L 标准品配制：每瓶加 50ml 10%异丙醇（自备），现用现配。			
10%异丙醇的配制：将异丙醇：试剂一=1:9 配制，即 5ml 异丙醇加入 45ml 试剂一。			
含氮量 5mg/L 标准品的配制：将含氮量 50mg/L 标准品：试剂一=1:9 稀释，即 5ml 含氮量 50mg/L 标准品加入 45ml 试剂一，现用现配。			

### 四、操作步骤：

#### 样本前处理

- 按照组织质量 (g) :提取液(mL)为 1:10 的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆。5000 rpm，4°C 离心 10 min，取上清。
- 按照上清 (ml) :试剂一(mL)为 1:9 的比例放入离心管中，在水浴锅中沸水煮15min，目的是沉淀样品中的蛋白质和氧化抗坏血酸，然后冷却备用。

#### 测定步骤

1. 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至580nm，蒸馏水调零。
2. 测定前将试剂恢复至常温；
3. 将含氮量5μg/mL标准品用提取液依次稀释至0、0.5、1、1.5、2、2.5μg/mL，备用；
4. 操作表：

	空白管	标准管	测定管
样品 (μL)	-	-	200
标准品 (μL)	-	200	-
水 (μL)	200	-	-
试剂二 (μL)	300	300	300
试剂三 (μL)	10	10	10
沸水浴 15min，自然冷却后取 200μl 于 96 孔板/酶标板读数。测定 580nm 处吸光值， 别记为 A <sub>空白</sub> 、A <sub>测定</sub> 。ΔA = ΔA <sub>测定</sub> - ΔA <sub>空白</sub> 。（空白管只做 1-2 管）			

### 五、植物总游离氨基酸含量计算：

1、标准曲线绘制：以吸光度值为横坐标，标准品浓度为纵坐标，绘制标准曲线  $y=kx+b$ ， $x$  为吸光度值， $y$  为标准品浓度浓度 (μg/mL)。根据标准曲线，将  $\Delta A$  带入公式计算出样本浓度 ( $y$ , μg/mL)；

2、植物总游离氨基酸含量计算

计算：每 g 样品所含的 μg 氨态氮。

$$\text{氨基态氮含量}(\mu\text{g/g 质量})=y \times V \times F \div V_{\text{提取}} \div W$$

**V**：样品提取液体积，1mL；

**V<sub>提取</sub>**：样品取液体积，0.6mL；

**W**：样本质量，g；

**F**：样品稀释倍数；

### 六、注意事项：

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。