

氨含量测定试剂盒说明书

微板法 96 样

一、产品简介：

氨可由微生物蛋白质分解代谢产生，此外肝脏疾病也会影响氨水平。

本试剂盒利用氨在强碱的环境下与次氯酸盐和苯酚作用，生成水溶性染料靛酚蓝，溶液颜色稳定。其在 630nm 处有特征吸收峰，吸光值与氨含量成正比。

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 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 6mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	液体 3mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	A: 液体 1.7mL×4 支 B: 液体 0.1mL×1 支	4℃ 保存	临用前取 15μL 的 B 液进一瓶 A 液中，混匀后作为试剂三使用。混匀后的试剂三一周内用完。
标准管	液体 2mL×1 支	4℃ 保存	标品浓度为 10μg/mL 的氨

三、所需仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、离心机、蒸馏水。

四、氨含量检测：

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 液体样品：

澄清的液体可直接检测；若浑浊则离心后取上清液检测。

② 组织样本：

取约 0.1g 组织样本，加 1mL 的提取液研磨，粗提液全部转移到 EP 管中，12000rpm，常温离心 10min，上清液待测。

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

③ 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

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

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min，设置温度在 37℃，设定波长到 630nm。

② 所有试剂解冻至室温，在 96 孔板中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	标准管 (仅做一次)	空白管 (仅做一次)
样本	15		

标准品		15	
蒸馏水	45	45	60
试剂一	60	60	60
试剂二	30	30	30
试剂三	60	60	60
混匀, 37 度放置 20min, 于 630nm 处读取 A, ΔA=A 测定-A 空白。			

- 【注】:** 1. 试剂一和二和三需分开加, 不能事先混匀。
 2. 测定管的 A 值若超过 1, 可把样本用蒸馏水进行稀释, 稀释倍数 D 代入计算公式。
 3. 若 ΔA 的差值在零附近徘徊, 可增加样本加样量 V1 (如增至 30μL, 则蒸馏水相应减少, 保持总体积不变), 则改变后的 V1 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、按液体体积计算:

$$\begin{aligned} \text{氨含量}(\mu\text{g/mL}) &= (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V1 \times D \\ &= 10 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{氨含量}(\mu\text{mol/L}) &= (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V1 \times D \times 10^3 \div Mr \\ &= 555.6 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D \end{aligned}$$

2、按样本鲜重计算:

$$\begin{aligned} \text{氨含量}(\mu\text{g/g}) &= (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 10 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按细菌/细胞数量计算:

$$\begin{aligned} \text{氨含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (500 \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.02 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D \end{aligned}$$

C 标准---标品浓度为 10μg/mL 的氨;

V1---加入样本体积, 0.015mL;

W---取样质量;

Mr---氨分子量, 18;

V_标---标准品加样体积, 0.015mL ;

V---提取液体积, 1mL;

500---细胞数量, 百万;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1。