

## 氨含量测定试剂盒说明书

(货号：ADS-W-N021 微板法 96 样 有效期：6 个月)

### 一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 6mL×1 瓶	4℃ 避光保存	
试剂二	液体 4mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	A: 液体 1.7mL×4 支 B: 液体 0.1mL×1 支	4℃ 避光保存	1. 临用前取 15 μL 的 B 液进一支 A 液中，混匀后作为试剂三使用； 2. 混匀后的试剂三一周内用完。
标准管	液体 2mL×1 支	4℃ 保存	1. 标品浓度为 10 μg/mL 的氨； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。

### 三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

### 四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

#### 1、样本提取：

##### 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<sup>4</sup>）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

#### 2、检测步骤：

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：

试剂组分（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, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。			

- 【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  $\Delta A$  的差值在零附近徘徊，可增加样本加样量 V1（如增至 30 $\mu$ L，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：

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

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

### 2、按样本鲜重计算：

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

### 3、按细菌/细胞数量计算：

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

### 4、按样本蛋白浓度计算：

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

C 标准---标品浓度为 10 $\mu$ g/mL 的氨；

V<sub>标</sub>---标准品加样体积，， 0.015mL ；

V1---加入样本体积， 0.015mL；

V---提取液体积， 1mL；

W---取样质量；

500---细胞数量， 百万；

Mr---氨分子量， 18；

D---稀释倍数， 未稀释即为 1。

Cpr---蛋白浓度 (mg/mL) ； 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。