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 比例进行提取。

2、上机检测：

① 打开酶标仪，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, △A=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△A 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：

氨含量(μg/mL)=($C_{标准}$×$V_{标}$)×ΔA÷($A_{标准}$-$A_{空白}$)÷V1×D

=10×ΔA÷($A_{标准}$-$A_{空白}$)×D

氨含量(μmol/L)=($C_{标准}$×$V_{标}$)×ΔA÷($A_{标准}$-$A_{空白}$)÷V1×D×10^3÷Mr

=555.6×ΔA÷($A_{标准}$-$A_{空白}$)×D

2、按样本鲜重计算：

氨含量(μg/g)=($C_{标准}$×$V_{标}$)×ΔA÷($A_{标准}$-$A_{空白}$)÷(W×V1÷V)×D

=10×ΔA÷($A_{标准}$-$A_{空白}$)÷W×D

3、按细菌/细胞数量计算：

氨含量(μg/10^4 cell)=($C_{标准}$×$V_{标}$)×ΔA÷($A_{标准}$-$A_{空白}$)÷(500×V1÷V)×D

=0.02×ΔA÷($A_{标准}$-$A_{空白}$)×D

C 标准---标品浓度为 10μg/mL 的氨；　　$V_{标}$---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。