

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K777-M

产品规格: 96T (40 samples)

检测仪器: 酶标仪(330-350 nm)

Elabscience[®] 氨比色法测试盒

Ammonia Colorimetric Assay Kit

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清(浆)、尿液、动(植)物组织及细胞样本中氨的含量。

检测原理

氨是生命系统氮的重要来源，是合成氨基酸所必需的。氨是通过氨基酸脱氨产生的代谢产物。它在正常和异常动物生理中都起着重要的作用。严重肝脏疾病时，氨不能从循环中清除，导致血氨增高，可引起肝性脑病（肝昏迷），临床中血氨测定是肝性脑病的重要实验诊断及监测指标。

本试剂盒的检测原理：酶催化氨反应消耗 NADH 造成其在 340 nm 处的吸光度下降，通过测量 340 nm 处吸光度下降的速度，可以测算氨的含量。

提供试剂和物品

| 编号 | 名称 | 规格 (Size)(96 T) | 保存方式 (Storage) |
|--------------------|--|--------------------|---------------------|
| 试剂一 (Reagent 1) | 缓冲液 (Buffer Solution) | 40 mL×2 瓶 | -20°C 避光 保存 6 个月 |
| 试剂二 (Reagent 2) | 底物 (Substrate) | 1.5 mL×1 支 | -20°C 避光 保存 6 个月 |
| 试剂三 (Reagent 3) | 促进剂 (Accelerant) | 粉剂×2 支 | -20°C 避光 保存 6 个月 |
| 试剂四 (Reagent 4) | 催化剂 (Catalyst) | 1.5 mL×1 支 | -20°C 避光 保存 6 个月 |
| 试剂五 (Reagent 5) | 10 mmol/L 标准品溶液 (10 mmol/L Standard Solution) | 1 mL×1 支 | -20°C 避光 保存 6 个月 |
| | 96 孔紫外酶标板 | 1 板 | |
| | 96 孔覆膜 | 2 张 | |
| | 样本位置标记表 | 1 张 | |

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(330-350 nm，最佳检测波长 340 nm)，恒温箱(37 ℃)

耗材：10 KD 超滤管

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温(25 ℃)。

② 试剂三工作液的配制：

取一支试剂三加入750 μL的试剂一溶解，置于冰上避光待用，未使用完的试剂-20 ℃可保存5天。

③ 测定工作液的配制：

将试剂一：试剂二：试剂三工作液：试剂四按体积比 = 20：2：1：4配制，现配现用，置于冰上避光待用，当天使用有效。

④ 对照工作液的配制：

将试剂一：试剂二：试剂三工作液按体积比 = 24：2：1配制，现配现用，置于冰上避光待用，当天使用有效。

⑤ 2 mmol/L 标准品的配制：

将试剂五：试剂一按体积比 = 1：4配制，稀释后的标准品溶液置于冰上避光待用，未用完的标准品溶液-20 ℃可保存2天。

⑥ 不同浓度标准品的稀释：

| 编号 | ① | ② | ③ | ④ | ⑤ | ⑥ | ⑦ | ⑧ |
|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 标准品浓度 (mmol/L) | 0 | 0.2 | 0.4 | 0.8 | 1 | 1.6 | 1.8 | 2 |
| 2 mmol/L 标准品 (μL) | 0 | 20 | 40 | 80 | 100 | 160 | 180 | 200 |
| 试剂一 (μL) | 200 | 180 | 160 | 120 | 100 | 40 | 20 | 0 |

样本准备

① 样本处理

血清(浆)、尿液：取200-400 μL 的血清(浆)或尿液于10 KD超滤管中(4 $^{\circ}\text{C}$ ，12000 $\times\text{g}$ ，离心25 min)超滤，收集外管中的滤出液，置于冰盒上待测，未用完的滤液可在-20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存，3天内使用为宜。

动(植)物组织样本：按照组织样本质量(g)：试剂一体积(mL)=1:9的比例匀浆(如0.1 g组织样本，加入0.9 mL试剂一)。4 $^{\circ}\text{C}$ ，10000 $\times\text{g}$ ，离心10 min，取上清于10 KD超滤管中(4 $^{\circ}\text{C}$ ，12000 $\times\text{g}$ ，离心25 min)超滤，收集外管中的滤出液，置于冰盒上待测，未用完的滤液可在-20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存，3天内使用为宜。

细胞样本：取 1×10^6 个细胞，加入200 μL 的试剂一匀浆，4 $^{\circ}\text{C}$ ，10000 $\times\text{g}$ ，离心10 min，取上清于10 KD超滤管中(4 $^{\circ}\text{C}$ ，12000 $\times\text{g}$ ，离心25 min)超滤，收集外管中的滤出液，置于冰盒上待测，未用完的滤液可在-20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存，3天内使用为宜。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.01-2.00 mmol/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

| 样本 | 稀释倍数 | 样本 | 稀释倍数 |
|-----------------------------|------|-----------------------------|------|
| 小鼠血清(浆) | 不稀释 | 大鼠血清 | 不稀释 |
| 人血清 | 不稀释 | 人尿液 | 5-10 |
| 10%小鼠肝组织 | 不稀释 | 10%小鼠肾组织 | 不稀释 |
| 10%小鼠脑组织 | 不稀释 | 10%西兰花组织 | 不稀释 |
| 10%豆芽组织 | 不稀释 | 1×10^6 个 Molt-4 细胞 | 不稀释 |
| 1×10^6 个 Jurkat 细胞 | 不稀释 | 1×10^6 个 293T 细胞 | 不稀释 |

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

样本若未测出值或测值偏低，可适当延长孵育时间再次测定。

操作步骤

- ① 标准孔：取 20 μL 不同浓度标准品溶液加入相应的酶标孔中。
测定孔：取 20 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。
对照孔：取 20 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。
- ② 向步骤①中的标准孔和测定孔中加入 140 μL 测定工作液，对照孔中加入 140 μL 对照工作液。
- ③ 振板 5 s，酶标仪 340 nm 波长下检测各孔 OD 值 A_1 ，25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min 后检测各孔 OD 值 A_2 ， $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

操作表

| | 标准孔 | 测定孔 | 对照孔 |
|---|-----|-----|-----|
| 不同浓度标准品(μL) | 20 | -- | -- |
| 待测样本(μL) | -- | 20 | 20 |
| 测定工作液(μL) | 140 | 140 | -- |
| 对照工作液(μL) | -- | -- | 140 |
| 振板 5 s，酶标仪 340 nm 波长下检测各孔 OD 值 A_1 ，25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min 后检测各孔 OD 值 A_2 ， $\Delta A = A_1 - A_2$ 。 | | | |

结果计算

标准曲线: $y = ax + b$

血清(浆)、尿液样本中氮含量计算公式:

$$\text{氮含量}(\text{mmol/L}) = (\Delta A_{340} - b) \div a \times f$$

动(植)物组织样本中氮含量计算公式:

$$\text{氮含量}(\mu\text{mol/g wet weight}) = (\Delta A_{340} - b) \div a \div m \times v \times f$$

细胞样本中氮含量计算公式:

$$\text{氮含量}(\mu\text{mol}/10^6) = (\Delta A_{340} - b) \div a \div n \times v \times f$$

注解:

y: $\Delta A = \Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}$ ($\Delta A = A_1 - A_2$, $\Delta A_{\text{空白}}$ 为标准品浓度为 0 mmol/L 的变化 OD 值)

x: 标准品的浓度

a: 标准曲线的斜率

b: 标准曲线的截距

ΔA_{340} : $\Delta A_{340} = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{对照}}$, $\Delta A = A_1 - A_2$

m: 样本质量, g

v: 加入的试剂一的体积, mL

n: 细胞个数, 10^6

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

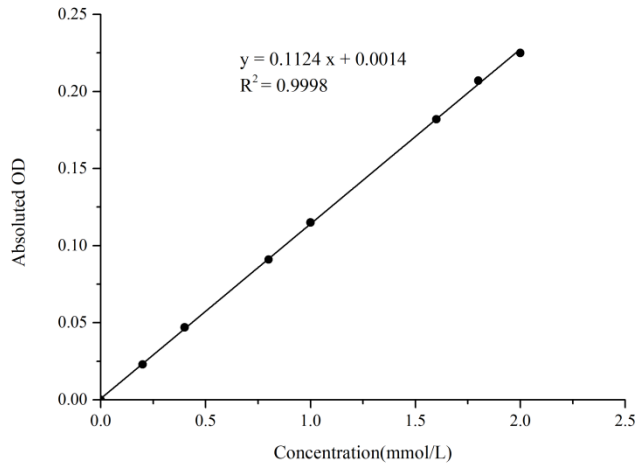
| | | | |
|-------|------------------|-----|----------|
| 检测范围 | 0.01-2.00 mmol/L | 批间差 | 7.2-9.6% |
| 灵敏度 | 0.01 mmol/L | 批内差 | 0.9-3.8% |
| 加标回收率 | 107-110% | | |

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量为20 μ L, 按照操作表进行操作记录OD值, 结果如下:

| 标准品浓度 (mmol/L) | 0 | 0.2 | 0.4 | 0.8 | 1 | 1.6 | 1.8 | 2 |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A ₁ 值 | 1.522 | 1.517 | 1.503 | 1.505 | 1.498 | 1.471 | 1.475 | 1.463 |
| | 1.504 | 1.510 | 1.498 | 1.490 | 1.462 | 1.481 | 1.459 | 1.452 |
| A ₂ 值 | 1.511 | 1.482 | 1.445 | 1.405 | 1.371 | 1.278 | 1.255 | 1.225 |
| | 1.492 | 1.475 | 1.439 | 1.385 | 1.337 | 1.288 | 1.242 | 1.217 |
| ΔA | 0.011 | 0.035 | 0.058 | 0.100 | 0.127 | 0.193 | 0.220 | 0.238 |
| | 0.012 | 0.035 | 0.059 | 0.105 | 0.125 | 0.193 | 0.217 | 0.235 |
| 平均 ΔA 值 | 0.012 | 0.035 | 0.058 | 0.103 | 0.126 | 0.193 | 0.219 | 0.237 |
| 绝对 OD 值 | 0 | 0.023 | 0.047 | 0.091 | 0.115 | 0.182 | 0.207 | 0.225 |

②绘制标准曲线, 如下图所示:

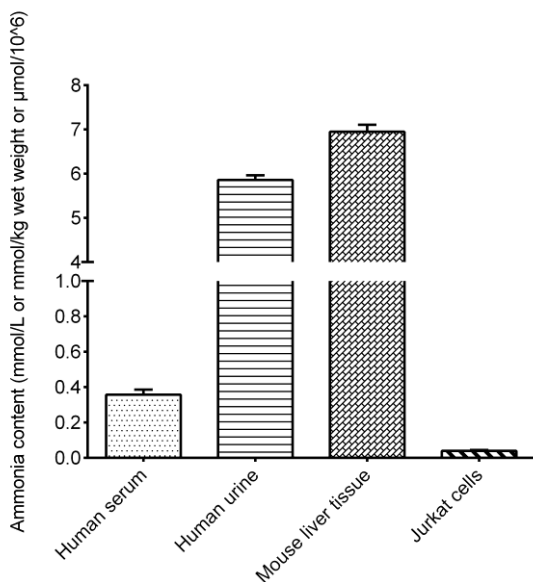


附录2 实例分析

例如小鼠肝组织(数据仅供参考):

取20 μL 10%小鼠肝组织匀浆加入到酶标板孔中,按操作表操作,结果如下:标准曲线: $y=0.1124x+0.0014$,测定孔 A_1 值为1.206, A_2 值为1.102, $\Delta A_{\text{测定}}=1.206-1.102=0.104$;对照孔 A_1 值为1.370, A_2 值为1.358, $\Delta A_{\text{对照}}=1.370-1.358=0.012$; $\Delta A_{340}=\Delta A_{\text{测定}}-\Delta A_{\text{对照}}=0.104-0.012=0.092$,计算结果为:氨含量($\mu\text{mol/g wet weight}$)= $(0.092-0.0014)\div 0.1124\div 0.1\times 0.9=7.254\ \mu\text{mol/g wet tissue}$

按说明书操作,测定人血清(加样量20 μL)、人尿液(加样量20 μL ,稀释20倍)、10%小鼠肝组织样本(加样量20 μL)、Jurkat细胞样本(1×10^6 ,加样量20 μL)中的氨(如下图):



声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

