

(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氮的含量。

检测原理

氮是生命系统氮的重要来源，是合成氨基酸所必需的。氮是通过氨基酸脱氮产生的代谢产物。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，氮不能从循环中清除，导致血氮增高，可引起肝性脑病（肝昏迷），临床中血氮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：酶催化氮反应消耗 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，可以测算氮的含量。

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	96 孔×1 块	无要求
	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°C)

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°C)。

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°C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°C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°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°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°C , $10000 \times \text{g}$, 离心10 min, 取上清于10 KD超滤管中(4°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°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°C , $10000 \times \text{g}$, 离心10 min, 取上清于10 KD超滤管中(4°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°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)、尿液样本中氨含量计算公式:

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

动(植)物组织样本中氨含量计算公式:

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

细胞样本中氨含量计算公式:

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

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

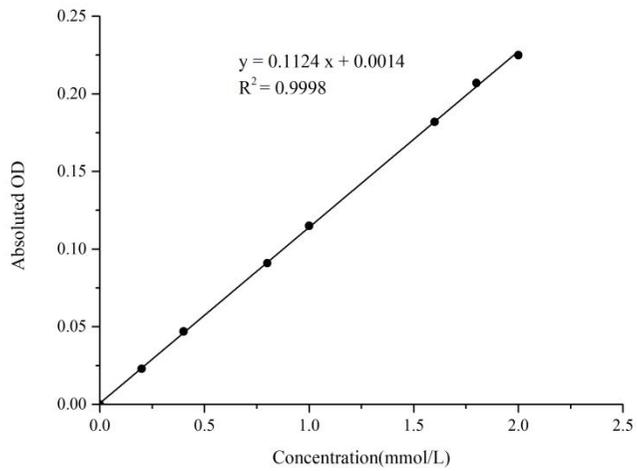
检测范围	0.01-2.00 mmol/L	批间差	7.2-9.6%
灵敏度	0.01 mmol/L	批内差	0.9-3.8%
加标回收率	107-110%		

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
Δ A	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 Δ A 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：

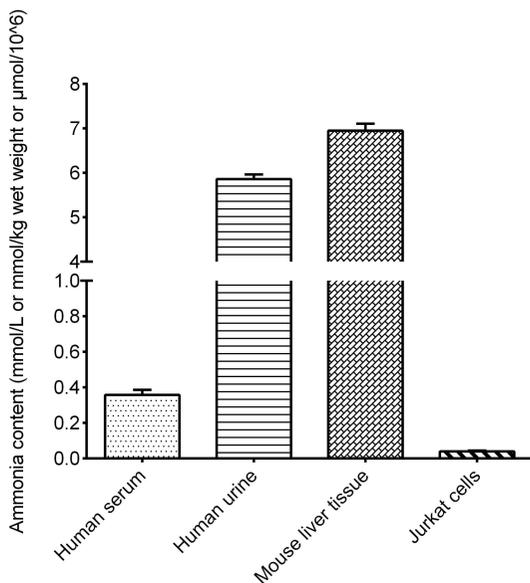


附录2 实例分析

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。

