天净沙系列

CAT#:7-C15194-15-7

低温运输，-20℃保存

天净沙

铵离子含量测定试剂盒

Ammonium Ion Assay Kit

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品用于测定铵离子（Ammonium Ion，CAS 15194-15-7）含量。其原理是谷氨酸脱氢酶催化铵根离子、α-酮戊二酸和NADH反应生成谷氨酸和NAD+。由于 NADH 在 340 nm 处有特征光吸收，故通过监测 NAPH 在 340 nm 处的吸光度降低即可间接计算出铵离子含量。本产品具有如下特点：

1. 即开即用，使用便捷，用户不需要优化条件，只需准备待测样本。
2. 灵敏度高，最低检测限为 33 μM。
3. 可以定量，线性范围在 100 μM-1 mM 之间。
4. 提供标准曲线法和消光系数法两种操作流程。
5. 本产品足够 100 次 1 mL 体系的比色皿检测或 400 次 250 μL 体系的 96 孔板检测。
6. 本产品只可用于科研。

规格及成分

本产品采用小扁盒包装

成份	编号	规格	包装
铵离子含量测定反应液	7-C15194-15-7r	125 mL	125 mL 本色瓶
10 mM 氯化铵溶液	C12125-02-9	1 mL	1.5 mL 本色管
铵离子含量测定底物干粉	7-C15194-15-7s	100 T	125 mL 本色瓶
谷氨酸脱氢酶干粉	CAS:9029-12-3	100 T	1.5 mL 红盖管
谷氨酸脱氢酶储存液	5-C9029-12-3	2 mL	2 mL 本色管
NADH 干粉	CAS:606-68-8	100 T	1.5 mL 棕色管
使用手册	7-C15194-15-7sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期一年。

自备试剂

待测样品，超纯水，比色皿或 96 孔板及与之匹配的分光光度计。

使用方法

建议首次实验时同时使用标准曲线法和消光系数法测定一个已知样本，比较两种方法的测定值。然后选择其中一种方法在后续实验中使用。

一、首次使用本试剂盒时配制下列溶液

1. 配制谷氨酸脱氢酶液：将 1 mL 谷氨酸脱氢酶储存液加入到装有谷氨酸脱氢酶干粉的管中，颠倒摇晃 20 次溶解，得谷氨酸脱氢酶液，放冰上待用。
2. 配制铵离子含量测定底物液：将 100 mL 铵离子含量测定反应液加入到装有铵离子含量测定底物干粉的瓶中，颠倒摇晃 20 次溶解，得铵离子含量测定底物液，放冰上待用。
3. 配制 NADH 溶液：将 1 mL 铵离子含量测定反应液加入到装有 NADH 干粉

的管中，颠倒摇晃 20 次溶解，得 NADH 溶液。

4. 如果一次实验没有用完上述溶液，需要放-20℃或更低温度保存。

二、制备待测样本

5. 用自备试剂制备待测样品，pH 控制在 8.6，由于多酚类化合物、含氯或含硫化合物等物质会严重影响谷氨酸脱氢酶的活性，故样本中不得含有这些物质。

6. 预留 10 mL 最后溶解样本的样本溶解液，作后续测光吸收时的阴性对照

三、选择 1：标准曲线法 1 mL 体系比色皿测定

7. 开机预热分光光度计并用超纯水调零后待用。

8. 标记 1-6 号共 6 个 1.5 mL 塑料离心管。

9. 使用梯度稀释法，用本试剂盒提供的铵离子含量测定反应液将 10 mM 氯化铵溶液配制一组浓度分别为 1 mM、750 μM、500 μM、250 μM、100 μM 和 0 μM 的氯化铵梯度稀释液（以下简称标曲梯度液）。

10. 设置反应。如果有 N 个待测样本，每个做 1 次重复，则需要设置 2N+6 个反应。在 2N+6 个 1.5 mL 离心管中按下表分别加入各成份。

成份	N 个待测样 无酶对照管	N 个 待测样本管	1-6 号标曲管
铵离子含量测定底物液	各 860 μL	各 860 μL	各 860 μL
NADH 溶液	各 20 μL	各 20 μL	各 20 μL
自备样本溶解液	各 100 μL	不加	不加
N 个待测样本	不加	各 100 μL	不加
标曲梯度液	不加	不加	各 100 μL 到对应的 1-6 号标曲管
涡旋振荡 30 秒混匀			

11. 跳过所用待测样本无酶对照管，加酶：一次处理几个样本根据所用分光光度计决定。下面以 1 次处理 1 个样本为例。在 1 个待测样本管中加入 20 μL 谷氨酸脱氢酶液并迅速混匀后立即计时，并在每半分钟测定 1 次 340 nm 的光吸收，共测定 5 分钟。

12. 在第 2 个待测样本管中加入 20 μL 谷氨酸脱氢酶液，重复上步操作，直到测试完所有样本（包括 6 个标曲样本）。

13. 若有样本的 ΔA/min 过高（>0.1/min），需稀释样本后再测。

14. 以氯化铵浓度为横轴，以△A/min 值为纵轴，绘制标准曲线，得到回归方程。一般 R2 不小于 0.98 即可，要求严格的不小于 0.99 才合规。

15. 在回归方程中代入待测样本的△A/min，即可计算出其铵离子浓度。

四、选择 2：消光系数法 1 mL 体系比色皿测定

16. 开机预热分光光度计并蒸馏水调零后待用。

17. 制备阳性对照：在一个 1.5 mL 塑料离心管中，加入 10 μL 10 mM 氯化铵溶液，再加入到 990 μL 铵离子含量测定反应液，涡旋 30 秒混匀即得。

18. 设置反应。在 1.5 mL 离心管中按下表分别加入各成份：

成份	阴性 对照管	阳性 对照管	N 个待测样本 无酶对照管	N 个待测 样本管
铵离子 含量测定底物液	860 μL	860 μL	各 860 μL	各 860 μL
NADH 溶液	20 μL	20 μL	各 20 μL	各 20 μL
自备样本溶解液	100 μL	不加	20 μL	不加
阳性对照	不加	100 μL	不加	不加
N 个待测样本	不加	不加	各 100 μL	各 100 μL

19. 涡旋振荡 30 秒混匀。

20. 测定 OD 步骤同第 10-12 步。

21. 计算每个样本的△A/min 真实值，它=样本△A/min 测定值-阴性对照的△A/min 测定值。

22. 将 OD340 换算成 NADH 浓度降低的量：根据朗伯-比尔定律 OD340=εlc=消光系数*光径*浓度，则所测 NADH 浓度降低的量=OD340/（消光系数*光径）。代入 NADH 在 340 nm 的消光系数 6220 L/cm*mol 和所用比色皿光径 1 cm，则 NADH 浓度降低的量=OD340/[(6220/cm*mol)*1cm]=（OD340/6220）mol/L=（OD340/6.22）μmol/mL。后面用 x 表示（OD340/6.22）。

23. 由于每分子铵离子反应消耗一分子的 NADH 故铵离子浓度=|x|μmol/mL。

24. 将铵离子浓度μM 转换成μmol：酶反应体积为 1 mL，故铵离子的μmol 数=浓度*1 mL=（|x| μmol/mL）*1 mL= |x| μmol。

四、96 孔板检测

25. 操作同上，只是由于反应体系是 250 μL 不是 1 mL，故在设置反应时，各成份的用量需要按比例降低。同时光径不是 1 cm，要根据所用 96 孔板修改（需要咨询厂家）。消光系数不变。

关联产品	谷氨酸脱氢酶活性测定试剂盒