

血氨含量

<编号：BA-W96-N(1721) 微量法 100 管/96 样>

注 意：正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

血氨主要来源是内源性氨和外源性氨。氨在血中保持恒定状态，即血氨的来源和去路保持动态平衡。氨是有毒物质，主要在肝脏进行代谢解毒。当肝功能严重损害时，氨不能被解毒。氨在中枢神经系统聚集，从而导致肝性脑病。

测定原理：

本法根据氨的靛酚蓝反应原理，通过蛋白沉淀剂将血清（浆）中蛋白沉淀后，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，生成的蓝色靛酚和氨的浓度成正比，在 630 nm 处有特殊吸收峰，据此可由吸光值计算出样本中血氨的含量。

最低检出限：0.025 $\mu\text{mol/mL}$

线性范围：0.05-6 $\mu\text{mol/mL}$

自备仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅/恒温培养箱、微量玻璃比色皿/96 孔板、可调式移液枪、蒸馏水、EP 管。

试剂清单：

试剂名称	规格	数目	贮藏	
提取液一	液体 20mL	x1	4°C	
提取液二	液体 20mL	x1	4°C	
试剂一	液体 12mL	x1	4°C,避光	
试剂二	液体 12mL	x1	4°C,避光	
标准品储备液	液体 1mL	x1	4°C,避光	100 $\mu\text{mol/mL}$ 氨标准液

样品要求:

- 1、红细胞中氨含量比血浆高数倍，故检测时样本需避免溶血，避免红细胞内的氨进入血浆。
- 2、由于血样离体后谷氨酰胺和多肽易水解释放出氨，故样本取样后需及时检测，在 2-8°C 最多保存 2-4 h，在-20°C 最多保存 24 h。
- 3、取样后要及时密封，避免氨的溢出。

实验准备:

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 630nm，分光光度计蒸馏水调零；
- 2、标准品的准备：将标准品储备液(100 μ mol/mL) 用蒸馏水稀释为 6、4、2、1、0.5、0.25、0.125 μ mol/mL 的标准溶液备用；

测定操作：

1、蛋白沉淀（在 EP 管中依次操作）

试剂名称 (μL)	测定管	空白管	标准管
血清 (浆)	50	-	-
蒸馏水	-	50	-
标准品	-	-	50
提取液一	125	125	125
提取液二	125	125	125
充分混匀，3500rpm 离心 10min，取上清液待测（记作 c） （离心后必须 20min 内进行显色反应）			

2、显色反应（在 EP 管中依次操作）

试剂名称 (μL)	测定管	空白管	标准管
上清液 (c 测定)	100	-	-
上清液 (c 空白)	-	100	-
上清液 (c 标准)	-	-	100
试剂一	100	100	100
充分混匀			
试剂二	100	100	100
充分混匀，37°C水浴 20min。取 200μL 反应液，于微量玻璃比色皿/96 孔板中测定 630nm 处吸光值，记作 A $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。			

注意：

- 1、如果测定吸光值超出线性范围吸光值，可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定；
- 2、所用器材和取血装置均应无氨；
- 3、试剂一应为无色透明液体，如果变色则不可使用；

结果计算：

一、标准曲线的绘制：

根据标准管的浓度 (x , $\mu\text{mol/mL}$) 和吸光值 ΔA 标准 (y , ΔA 标准), 建立标准曲线。
根据标准曲线, 将 ΔA (y , ΔA) 带入公式计算样本浓度 (x , $\mu\text{mol/mL}$)。

二、血氨含量的计算：

$$\begin{aligned}\text{血氨含量 } (\mu\text{mol/mL}) &= x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \\ &= x\end{aligned}$$

$V_{\text{样}}$ ：加入的样本体积, 0.05mL。

预实验的意义：

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测, 以免造成试剂盒和样本的浪费 (比如低表达处理的样本);
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程, 尤其是初次使用生化试剂盒测定;
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适;
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题, 以便于及时作出调整;
- 5、通过 3 - 5 组预实验, 判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围, 指导实验样本稀释比例。