

尿素 (Urea) 含量 (酶法) 检测试剂盒说明书

(微板法 96 样)

一、产品简介:

尿素 (Urea) 又称碳酰胺, 旧称尿素氮 (BUN), 是哺乳动物和某些鱼类体内蛋白质代谢分解的主要含氮产物, 也是目前含氮量最高的氮肥。

该试剂盒利用尿素在脲酶的作用下水解产生氨离子和二氧化碳, 氨离子在碱性介质中与酚显色剂生成蓝色物质, 该物质的生成量与尿素含量成正比。通过于625nm处检测该有色物质含量进而得出尿素氮含量。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 0.5mL×2 支	-20°C保存	可-20°C分装冻存, 尽量减少反复冻融。
试剂二	液体 3mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	试剂三 A 1.5mL×2 支 试剂三 B 0.2mL×1 支	4°C保存	临用前向一支试剂三 A 中加入 46μL 的试剂三 B, 混匀备用。
标准管	粉体 mg×2 支	4°C保存	每支临用前加1mL去离子水溶解, 即浓度为6mg/mL的尿素, 检测前再用去离子水稀释200倍 (5:995) 即成 0.03mg/mL (0.5mmol/L) 的尿素。

三、所需仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、天平、移液器、离心机、去离子水。

四、尿素 (Urea) 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: 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 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 生理盐水, 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 室温离心 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 的比例进行提取。

- ③ 组织样本: 取约 0.1g 组织, 加入 1mL 生理盐水, 进行冰浴匀浆。4°C×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【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。

2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30min, 设置温度在 37°C, 设定波长到 625nm。
- ② 做实验前选取 2 个样本, 找出适合本次检测样本的稀释倍数 D (如: 尿液样本可用蒸馏水稀释 100 倍)。

③ 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	空白管 (仅做一次)	标准管 (仅做一次)
样本	20		
去离子水		20	
标准品			20
试剂一	10	10	10
去离子水	130	130	130
混匀，37°C避光反应 15min			
试剂二	20	20	20
试剂三	20	20	20
混匀，37°C避光反应 20min，于 625nm 处读取吸光值 A， ΔA=A 测定-A 空白。			

【注】：1.测定管 A 值若超过 1.5，样本可用生理盐水或去离子水进行稀释，稀释倍数 D 代入公式。

2.若ΔA 的差值在小于 0.01，可增加样本加样量 V1（如增至 50μL，则水相应减少，保持总体积不变；空白管和标准管维持不变），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：

$$\text{尿素(mg/L)}=(C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times 10^3 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V1 \times D = 30 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

$$\text{尿素(mmol/L)}=(C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \div 60.04 \times 10^3 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V1 \times D = 0.5 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

$$\text{尿素氮(mmol/L)}=(C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \div 60.04 \times 10^3 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V1 \times 2 \times D = 1 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

$$\text{尿素氮(mg/dL)}=(C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \div 60.04 \times 10^2 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V1 \times 2 \times 14 \times D = 1.4 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

2、按细胞数量计算：

$$\text{尿素(ng/10}^4 \text{ cell)}=(C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times 10^6 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (500 \times V1 \div V) \times D = 60 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

$$\text{尿素(nmol/10}^4 \text{ cell)}=(C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \div 60.04 \times 10^6 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (500 \times V1 \div V) \times D = \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

$$\begin{aligned} \text{尿素氮(nmol/10}^4 \text{ cell)} &= (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \div 60.04 \times 10^6 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (500 \times V1 \div V) \times 2 \times D \\ &= 2 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D \end{aligned}$$

3、按样本质量计算：

$$\text{尿素(μg/g)}=(C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times 10^3 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (W \times V1 \div V) \times D = 30 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D$$

$$\text{尿素(μmol/g)}=(C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \div 60.04 \times 10^3 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (W \times V1 \div V) \times D = 0.5 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D$$

$$\begin{aligned} \text{尿素氮(μmol/g)} &= (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \div 60.04 \times 10^3 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (W \times V1 \div V) \times 2 \times D \\ &= 1 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D \end{aligned}$$

C_{标准}---尿素标品浓度，0.03mg/mL； W---取样质量，g； V1---加入样本体积，0.02mL；

V_标---加入标准品体积，0.02mL； V---提取液体积，1mL； 14---氮元素分子量；

2---一分子尿素含有 2 个氮元素； 60.04---尿素分子量； D---稀释倍数，未稀释即为 1；

500---细胞数量，万。