

尿素 (Urea) 含量 (酶法) 检测试剂盒说明书

(货号: G1201W 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 640nm 处检测该有色物质含量进而计算得出尿素氮含量。

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 5.5mL×1 瓶	-20℃保存	可-20℃分装冻存, 尽量减少反复冻融。
试剂二	液体 22mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	试剂三 A: 1mL×3 支 试剂三 B: 0.2mL×1 支	4℃保存	临用前向一支试剂三 A(1mL)中加入 30μL 试剂三 B(1mL:30μL), 混匀后再用去离子水稀释十倍(1:9)备用, 避光保存, 最好一周内用完。
标准管	粉体 mg×2 支	4℃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 20 倍 (50:950) 即成 0.3mg/mL (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、水浴锅/金属浴/恒温培养箱、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, 了解本批样品和实验流程, 避免样本和试剂浪费!

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℃×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℃, 设定波长到 640nm。
- 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 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)	标准管 (仅做一次)
样本	5		
去离子水		5	
标准品			5
试剂一	50	50	50
混匀，37°C反应 10min。			
试剂二	200	200	200
试剂三	200	200	200
混匀，37°C孵育 30min 后，取出 200μL 澄清液体至 96 孔板中，于 640nm 处读吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。			

【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.若已知样本自身含有氨离子，可增加一个对照管 (5μL 样本+50μL 去离子水，37°C反应 10min 后，再依次加入 200μL 试剂二和 200μL 试剂三，37°C反应 30min 后读值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。若对照管值低于空白管值可以省略掉对照管的测定。

五、结果计算：

1、按液体体积计算：

$$\text{尿素(mg/L)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times 10^3 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_1 \times D = 300 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

$$\text{尿素(mmol/L)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_1 \times D = 5 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

$$\text{尿素氮(mmol/L)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_1 \times 2 \times D = 10 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

$$\text{尿素氮(mg/dL)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_1 \times 2 \times 14 \div 10 \times D = 14 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

2、按细胞数量计算：

$$\text{尿素(ng/10}^4\text{ cell)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times 10^6 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (500 \times V_1 \div V) \times D = 600 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

$$\text{尿素(nmol/10}^4\text{ cell)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times 10^3 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (500 \times V_1 \div V) \times D = 10 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

$$\text{尿素氮(nmol/10}^4\text{ cell)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (500 \times V_1 \div V) \times 2 \times D = 20 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

3、按样本质量计算：

$$\text{尿素(μg/g)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times 10^3 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (W \times V_1 \div V) \times D = 300 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D$$

$$\text{尿素(μmol/g)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (W \times V_1 \div V) \times D = 5 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D$$

$$\text{尿素氮(μmol/g)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (W \times V_1 \div V) \times 2 \times D = 10 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D$$

W---取样质量，g；

C_{标准}---尿素标品浓度，0.3mg/mL 即 5mmol/L=5μmol/mL；

V₁---加入样本体积，0.005mL；

V_标---加入标准品体积，0.005mL；

V---提取液体积，1mL；

14---氮元素分子量；

500---细胞数量，万；

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。