

尿素 (Urea) 含量 (酶法) 检测试剂盒说明书

(货号: ADS-F-N013-48 分光法 48 样)

一、指标介绍:

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:

| 试剂组分 | 试剂规格 | 存放温度 | 注意事项 |
|------|------------------------------------|---------|--|
| 试剂一 | 液体 0.8mL×2 支 | -20°C保存 | 每支: 1. 使用前甩几下使试剂落入底部; 2. 用不完可-20°C分装冻存; 3. 尽量减少反复冻融; 4. 保存周期与试剂盒有效期相同。 |
| 试剂二 | 液体 4mL×1 瓶 | 4°C避光保存 | |
| 试剂三 | 试剂三 A 2.5mL×2 瓶 试剂三 B 0.2mL×1 支 | 4°C保存 | 每瓶: 1. 使用前甩几下使试剂落入底部; 2. 临用前向试剂三 A 中加入 77μL 的试剂三 B, 混匀备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。 |
| | | 4°C避光保存 | |
| 标准管 | 粉体 2 支 | 4°C保存 | 每支: 1. 临用前 8000g 4°C离 2min 使试剂落入管底; 2. 临用前加 1mL 去离子水溶解, 浓度为 6mg/mL 的尿素标准品母液; 3. 检测前再用去离子水稀释 200 倍, 20μl 母液加 3.98ml 去离子水, 即成 0.03mg/mL (0.5mmol/L) 的尿素; 4. 保存周期与试剂盒有效期相同。 |

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、离心管、可见分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

- ① 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 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。
- ③ 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（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、检测步骤：

- ① 打开可见分光光度计，设置温度 37（若仪器无法控温，则等待仪器过自检程序即可），调节波长到 625nm，蒸馏水调零。
- 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：

| 试剂组分（μL） | 测定管 | 空白管 （仅做一次） | 标准管 （仅做一次） |
|--|-----|---------------|---------------|
| 样本 | 60 | | |
| 去离子水 | | 60 | |
| 标准品 | | | 60 |
| 试剂一 | 30 | 30 | 30 |
| 去离子水 | 550 | 550 | 550 |
| 混匀，37°C 避光反应 15min | | | |
| 试剂二 | 80 | 80 | 80 |
| 试剂三 | 80 | 80 | 80 |
| 混匀，37°C 避光反应 20min，全部澄清液体转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，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 差值在小于 0.01，可增加样本加样量 V1（如增至 120μL，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 V1 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本质量计算：

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

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

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

2、按液体体积计算：

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

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

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

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

3、按蛋白浓度计算：

$$\text{尿素}(\mu\text{g}/\text{mg prot})=(C_{\text{标准}}\times V_{\text{标}})\times 10^3\times \Delta A\div(A_{\text{标准}}-A_{\text{空白}})\div(C_{\text{pr}}\times V_1\div V)\times D=30\times \Delta A\div(A_{\text{标准}}-A_{\text{空白}})\div C_{\text{pr}}\times D$$

$$\text{尿素}(\mu\text{mol}/\text{mg prot})=(C_{\text{标准}}\times V_{\text{标}})\div 60.04\times 10^3\times \Delta A\div(A_{\text{标准}}-A_{\text{空白}})\div(C_{\text{pr}}\times V_1\div V)\times D=0.5\times \Delta A\div(A_{\text{标准}}-A_{\text{空白}})\div C_{\text{pr}}\times D$$

$$\text{尿素氮}(\mu\text{mol}/\text{mg prot})=(C_{\text{标准}}\times V_{\text{标}})\div 60.04\times 10^3\times \Delta A\div(A_{\text{标准}}-A_{\text{空白}})\div(C_{\text{pr}}\times V_1\div V)\times 2\times D=1\times \Delta A\div(A_{\text{标准}}-A_{\text{空白}})\div C_{\text{pr}}\times D$$

4、按细胞数量计算：

$$\text{尿素}(\text{ng}/10^4\text{cell})=(C_{\text{标准}}\times V_{\text{标}})\times 10^6\times \Delta A\div(A_{\text{标准}}-A_{\text{空白}})\div(500\times V_1\div V)\times D=60\times \Delta A\div(A_{\text{标准}}-A_{\text{空白}})\times D$$

$$\text{尿素}(\text{nmol}/10^4\text{cell})=(C_{\text{标准}}\times V_{\text{标}})\div 60.04\times 10^6\times \Delta A\div(A_{\text{标准}}-A_{\text{空白}})\div(500\times V_1\div V)\times D=\Delta A\div(A_{\text{标准}}-A_{\text{空白}})\times D$$

$$\text{尿素氮}(\text{nmol}/10^4\text{cell})=(C_{\text{标准}}\times V_{\text{标}})\div 60.04\times 10^6\times \Delta A\div(A_{\text{标准}}-A_{\text{空白}})\div(500\times V_1\div V)\times 2\times D=2\times \Delta A\div(A_{\text{标准}}-A_{\text{空白}})\times D$$

$C_{\text{标准}}$ ---尿素标品浓度，0.03mg/mL； W ---取样质量，g； V_1 ---加入样本体积，0.06mL；

$V_{\text{标}}$ ---加入标准品体积，0.06mL； 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。 C_{pr} ---上清液蛋白浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。