

## 尿素（Urea）含量（酶法）检测试剂盒说明书

（货号：BP10136F 分光法 48 样 有效期：3 个月）

### 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℃保存 | 每支：<br>1. 用前甩几下使试剂落入底部；<br>2. 用不完可-20℃分装冻存；<br>3. 尽量减少反复冻融；<br>4. 保存周期与试剂盒有效期相同。                                                                                               |
| 试剂二  | 液体 4mL×1 瓶                         | 4℃避光保存 |                                                                                                                                                                                |
| 试剂三  | 试剂三 A 2.5mL×2 瓶<br>试剂三 B 0.2mL×1 支 | 4℃保存   | 每瓶：<br>1. 用前甩几下使试剂落入底部；<br>2. 临用前向试剂三 A 中加入 77μL 的试剂三 B，混匀备用；<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。                                                                                             |
|      |                                    | 4℃避光保存 |                                                                                                                                                                                |
| 标准管  | 粉体 2 支                             | 4℃保存   | 每支：<br>1. 临用前 8000g 4℃离 2min 使试剂落入管底；<br>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；<br>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；<br>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、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℃×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（ $10^4$ ）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

## 2、检测步骤：

- ① 打开分光光度计，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（ $\mu\text{L}$ ）                                                                                            | 测定管 | 空白管<br>（仅做一次） | 标准管<br>（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，<br>$\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。 |     |               |               |

【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  $\Delta A$  差值在小于 0.01，可增加样本加样量 V1（如增至 120 $\mu\text{L}$ ，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。

- 3.试剂二和试剂三禁止预混使用，需依次加入。

## 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：

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

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

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

$$\text{尿素氮(mg/dL)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \div 60.04 \times 10^2 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_1 \times 2 \times 14 \times D = 1.4 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

3、按蛋白浓度计算：

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

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

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

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。  $C_{\text{pr}}$ ---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。