

尿素 (Urea) 含量 (酶法) 检测试剂盒说明书

(货号: BP10136W 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标简介:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 0.5mL×2 支	-20℃保存	每支: 1. 使用前甩几下使试剂落入底部; 2. 用不完可-20℃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 3mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂三	试剂三 A 1.5mL×2 支 试剂三 B 0.2mL×1 支	4℃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 46 μL 的试剂三 B, 混匀备用; 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: 1. 临用前 8000g 4℃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)、天平、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)、96 孔板、离心管、酶标仪、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（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、检测步骤：

- ① 打开酶标仪，设置温度 37°C（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。
- ③ 所有试剂解冻至室温，按照下表在 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。

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：

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

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

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

3、按液体体积计算：

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

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

$$\text{尿素氮}(\text{mmol/L}) = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \div 60.04 \times 10^3 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_1 \times 2 \times D = 1 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

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

4、按细胞数量计算：

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

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

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

$C_{\text{标准}}$ ---尿素标品浓度，0.03mg/mL； W ---取样质量，g； V_1 ---加入样本体积，0.02mL；

$V_{\text{标}}$ ---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。

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。