

尿素含量（二乙酰一肟法）检测试剂盒说明书

（货号：BP10383W 微板法 96 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

在加热和强酸条件下，尿素与二乙酰一肟及安替比林反应呈黄色，在波长460 nm 处有特征吸收峰。通过检测生成的黄色物质在460nm处的增加量进而得出样本中尿素含量。

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	粉体 1 瓶	4℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加 3mL 蒸馏水溶解； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同
试剂二	粉体 1 瓶	4℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 2.4mL 蒸馏水溶解； 3. 再缓慢加 2.4mL 磷酸混匀； 4. 最后再加 4.8mL 硫酸混匀，冷却至室温备用； 5. 保存周期与试剂盒有效期相同
标准管	粉体 2 支	4℃ 保存	每支： 1. 临用前每支加 1mL 蒸馏水溶解（4mg/mL）； 2. 再用蒸馏水稀释 40 倍（1:39）成 0.1mg/mL； 3. 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）、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：0.1g 组织样本，加 1mL 的蒸馏水研磨，超声萃取 10min 后定容至 1mL，室温静置 30min，12000rpm，常温离心 10min，上清液待测。
- ② 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、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min，设置温度在 37℃，设定波长到 460nm。
- 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。
- 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	对照管	空白管 （仅做一次）	标准管 （仅做一次）
样本	50	50		
蒸馏水		20	50	

标准品				50
试剂一	20		20	20
试剂二	40	40	40	40
混匀，95°C沸水浴反应 20min				
蒸馏水	190	190	190	190
混匀，（若浑浊则 5000rpm 室温离心 5min 后取上清液测定）取 200μL 至 96 孔板中，于 460nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。				

【注】：测定管的 A 值若超过 1.5，可把样本再进行稀释，稀释倍数 D 代入计算公式。

五、结果计算：

1、按照组织质量计算：

$$\text{尿素含量(mg/g)} = (C_{\text{标准}} \times V_1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_1 \div V \times W) \times D = 0.1 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D$$

$$\begin{aligned} \text{尿素含量(mg/kg)} &= (C_{\text{标准}} \times V_1) \times 10^3 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_1 \div V \times W) \times D \\ &= 100 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{尿素氮含量}(\mu\text{g/g}) &= (C_{\text{标准}} \times V_1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_1 \div V \times W) \times D \times 10^3 \div 60.04 \times 2 \times 14 \\ &= 46.64 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D \end{aligned}$$

2、按照液体体积计算：

$$\text{尿素含量(mg/mL)} = (C_{\text{标准}} \times V_1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_1 \times D = 0.1 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

$$\begin{aligned} \text{尿素氮含量(mg/dL)} &= (C_{\text{标准}} \times V_1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_1 \times D \times 100 \div 60.04 \times 2 \times 14 \\ &= 4.664 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D \end{aligned}$$

3、按照蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{尿素含量(mg/mg prot)} &= (C_{\text{标准}} \times V_1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_1 \div V \times C_{\text{pr}}) \times D \\ &= 0.1 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}} \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{尿素含量(mg/mg prot)} &= (C_{\text{标准}} \times V_1) \times 10^3 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_1 \div V \times C_{\text{pr}}) \times D \\ &= 100 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}} \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{尿素氮含量}(\mu\text{g/mg prot)} &= (C_{\text{标准}} \times V_1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_1 \div V \times C_{\text{pr}}) \times D \times 10^3 \div 60.04 \times 2 \times 14 \\ &= 46.64 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}} \times D \end{aligned}$$

C 标准---尿素标品浓度，0.1mg/mL； D---稀释倍数，未稀释即为 1；
 60.04---尿素分子量； 2---一分子尿素含有 2 个氮元素；
 14---氮元素分子量； W---取样质量，g；
 V---提取液体积，1mL； V1---加入样本体积，0.05mL。
 Cpr---蛋白浓度（mg/mL）； 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。