

尿素（Urea）含量（酶法）检测试剂盒说明书

（分光法 48 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 4.5mL×1 支	-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:0.8mL×3 支 试剂三 B:0.2mL×1 支	4℃保存	临用前向一支试剂三 A(0.8mL)中加入24μL 的试剂三 B(0.8mL:24μL)，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40倍（25:975）即成0.15mg/mL（2.5mmol/L）的尿素。

三、所需仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、天平、水浴锅/金属浴/恒温培养箱、移液器、离心机、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：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（10⁴）：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 可见分光光度计预热 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	8		
去离子水		8	
标准品			8
试剂一	80	80	80
混匀，37℃反应 10min。			
试剂二	350	350	350
试剂三	350	350	350
混匀，37℃孵育 30min 后，全部澄清液体转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 640nm 处读取吸光值 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（8μL 样本+80μL 去离子水，37℃反应 10min 后，再依次加入 350μL 试剂二和 350μL 试剂三，37℃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：

$$\text{尿素(mg/L)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times 10^3 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_1 \times D = 150 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

$$\text{尿素(mmol/L)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_1 \times D = 2.5 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

$$\text{尿素氮(mmol/L)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_1 \times 2 \times D = 5 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

$$\text{尿素氮(mg/dL)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_1 \times 2 \times 14 \div 10 \times D = 7 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

2、按细胞数量计算：

$$\text{尿素(ng/10}^4\text{cell)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times 10^6 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (500 \times V_1 \div V) \times D = 300 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

$$\text{尿素(nmol/10}^4\text{cell)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times 10^3 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (500 \times V_1 \div V) \times D = 5 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

$$\text{尿素氮(nmol/10}^4\text{ cell)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times 10^3 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (500 \times V_1 \div V) \times 2 \times D = 10 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

3、按样本质量计算：

$$\text{尿素(μg/g)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times 10^3 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (W \times V_1 \div V) \times D = 150 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D$$

$$\text{尿素(μmol/g)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (W \times V_1 \div V) \times D = 2.5 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D$$

$$\text{尿素氮(μmol/g)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (W \times V_1 \div V) \times 2 \times D = 5 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D$$

W---取样质量，g；

$C_{\text{标准}}$ ---尿素标品浓度，0.15mg/mL 即 2.5mmol/L=2.5μmol/mL；

V_1 ---加入样本体积，0.008mL；

$V_{\text{标}}$ ---加入标准品体积，0.008mL；

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。