尿素（Urea）含量（酶法）检测试剂盒说明书

（微板法 96 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 5.5mL×1 瓶	-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: 1mL×3 支 试剂三 B: 0.2mL×1 支	4℃保存	临用前向一支试剂三 A(1mL)中加入 30μL 试剂三 B(1mL:30μL)，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20倍（50:950）即成0.3mg/mL（5mmol/L）的尿素。

三、所需仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、天平、移液器、离心机、水浴锅/金属浴/恒温培养箱、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：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（10^4）：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 酶标仪预热 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	5		
去离子水		5	
标准品			5
试剂一	50	50	50
混匀，37℃反应 10min。			
试剂二	200	200	200
试剂三	200	200	200
混匀，37℃孵育 30min 后，取出 200μL 澄清液体至 96 孔板中，于 640nm 处读吸光值 A，△A=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.若已知样本自身含有氨离子，可增加一个对照管（5μL 样本+50μL 去离子水，37℃反应 10min 后，再依次加入 200μL 试剂二和 200μL 试剂三，37℃反应 30min 后读值，△A=A 测定-A 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：

尿素(mg/L)=($C_{标准}$×$V_{标}$)×10^3×△A÷($A_{标准}$-$A_{空白}$)÷V1×D=300×△A÷($A_{标准}$-$A_{空白}$)×D

尿素(mmol/L)=($C_{标准}$×$V_{标}$)×△A÷($A_{标准}$-$A_{空白}$)÷V1×D=5×△A÷($A_{标准}$-$A_{空白}$)×D

尿素氮(mmol/L)=($C_{标准}$×$V_{标}$)×△A÷($A_{标准}$-$A_{空白}$)÷V1×2×D=10×△A÷($A_{标准}$-$A_{空白}$)×D

尿素氮(mg/dL)=($C_{标准}$×$V_{标}$)×△A÷($A_{标准}$-$A_{空白}$)÷V1×2×14÷10×D=14×△A÷($A_{标准}$-$A_{空白}$)×D

2、按细胞数量计算：

尿素(ng/10^4 cell)= ($C_{标准}$×$V_{标}$)×10^6×△A÷($A_{标准}$-$A_{空白}$)÷(500×V1÷V)×D=600×△A÷($A_{标准}$-$A_{空白}$)×D

尿素(nmol/10^4 cell)=($C_{标准}$×$V_{标}$)×10^3×△A÷($A_{标准}$-$A_{空白}$)÷(500×V1÷V)×D=10×△A÷($A_{标准}$-$A_{空白}$)×D

尿素氮(nmol/10^4 cell)=($C_{标准}$×$V_{标}$)×△A÷($A_{标准}$-$A_{空白}$)÷(500×V1÷V)×2×D=20×△A÷($A_{标准}$-$A_{空白}$)×D

3、按样本质量计算：

尿素(μg/g)= ($C_{标准}$×$V_{标}$)×10^3×△A÷($A_{标准}$-$A_{空白}$)÷(W×V1÷V)×D=300×△A÷($A_{标准}$-$A_{空白}$)÷W×D

尿素(μmol/g)=($C_{标准}$×$V_{标}$)×△A÷($A_{标准}$-$A_{空白}$)÷(W×V1÷V)×D=5×△A÷($A_{标准}$-$A_{空白}$)÷W×D

尿素氮(μmol/g)=($C_{标准}$×$V_{标}$)×△A÷($A_{标准}$-$A_{空白}$)÷(W×V1÷V) ×2×D=10×△A÷($A_{标准}$-$A_{空白}$)÷W×D

W---取样质量，g；　　$C_{标准}$---尿素标品浓度，0.3mg/mL 即 5mmol/L=5μmmol/mL；

V1---加入样本体积，0.005mL；　　$V_{标}$---加入标准品体积，0.005mL；

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。