

尿素 (Urea) 含量 (酶法) 检测试剂盒说明书

(货号: G1201F 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 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:

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|------|------------------------|--------|---|
| 试剂一 | 粉体 mg×1 支 | -20℃保存 | 临用前甩几下使粉体落入底部, 再加 1.7mL 的蒸馏水溶解备用。 |
| 试剂二 | 液体 4mL×1 瓶 | 4℃保存 | |
| 试剂三 | 试剂三 A×2 支 试剂三 B×1 支 | 4℃保存 | 临用前向一支试剂三 A 中加入 77μL 的试剂三 B, 混匀备用。 |
| 标准管 | 粉体 mg×2 支 | 4℃保存 | 每支临用前加 1mL 蒸馏水溶解, 即浓度为 6mg/mL 的尿素, 检测前再用蒸馏水稀释 200 倍 (5:995) 即成 0.03mg/mL (0.5mmol/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、移液器、离心机、蒸馏水。

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, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

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 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 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 625nm。

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 | 60 | | |
| 蒸馏水 | | 60 | |
| 标准品 | | | 60 |
| 试剂一 | 30 | 30 | 30 |
| 蒸馏水 | 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, $\Delta A = A$ 测定-A 空白。 | | | |

【注】: 1.测定管 A 值若超过 1.5, 可把样本用生理盐水或蒸馏水进行稀释, 稀释倍数 D 代入计算公式。

2.若 ΔA 差值在零附近徘徊, 可增加样本加样量 V_1 (如增至 120 μL , 则蒸馏水相应减少, 保持总体积不变; 空白管和标准管维持不变), 则改变后 V_1 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、按液体体积计算:

$$\begin{aligned} \text{尿素含量}(\text{mg/L}) &= (\text{C 标准} \times V_1) \times 10^3 \times \Delta A \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div V_1 \times D \\ &= 30 \times \Delta A \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{尿素含量}(\text{mmol/L}) &= (\text{C 标准} \times V_1) \div 60.04 \times 10^3 \times \Delta A \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div V_1 \times D \\ &= 0.5 \times \Delta A \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times D \end{aligned}$$

2、按细胞数量计算:

$$\begin{aligned} \text{尿素含量}(\text{ng}/10^4 \text{ cell}) &= (\text{C 标准} \times V \text{ 标}) \times 10^6 \times \Delta A \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (500 \times V_1 \div V) \times D \\ &= 60 \times \Delta A \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times D \end{aligned}$$

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

C 标准---尿素标品浓度, 0.03mg/mL;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

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;

60.04---尿素分子量;

500---细胞数量, 万。