

脲酶 (Urease, UE) 试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

UE 能够水解尿素，产生氨和碳酸。UE 活性与有机物质含量、全氮和速效氮含量呈正相关， 反应了氮素状况。

测定原理：

利用靛酚蓝比色法测定脲酶水解尿素产生的 NH₃-N。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰、甲苯（不允许快递）和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：液体 60mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：粉剂×1 瓶，临用前加入 9mL 蒸馏水，充分溶解待用，4℃保存；用不完的试剂 4℃ 保存；

试剂二：液体 22mL×1 瓶，4℃保存；

试剂三 A 液：液体×1 支，4℃保存；

试剂三 B 液：液体×1 瓶，4℃保存；临用前将 A 液倒入 B 液中混合，待用；用不完的试剂 4℃保存一周；

试剂四：液体 2mL×1 瓶，4℃保存；

样本的前处理：

1、细菌、细胞或组织样品的制备：

细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量 (10⁴ 个)：提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液)，超声波破碎细菌或细胞 (冰浴，功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次)；8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

组织：按照组织质量 (g)：提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液)，进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、血清 (浆) 样品：直接检测。

测定步骤:

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 578nm，蒸馏水调零。

试剂名称	测定管	对照管
样本 (μL)	20	20
试剂一 (μL)	90	
蒸馏水 (μL)		90
试剂二 (μL)	190	190

2、酶促反应

混匀，放入 37℃水浴 1h 后，10000g 25℃离心 10min，取上清液。

2、将上清液稀释 10 倍（取 0.1mL 上清液，加入 0.9mL 蒸馏水）。

3、测氨量（在微量石英比色皿或 96 孔板中加入下列试剂）

	测定管	对照管
稀释后的上清液 (μL)	80	80
试剂三 (μL)	15	15
试剂四 (μL)	15	15

充分混匀，室温放置 20min

蒸馏水 (μL)	90	90
----------	----	----

混匀，于 578nm 处，蒸馏水调零，读吸光值 A，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。每个测定管设一个对照管。

UE 活力计算:

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.0915x + 0.0373$ ；x 为标准品浓度 ($\mu\text{g/mL}$)，y 为吸光值 A。

1、血清（浆）UE 活力的计算：

单位的定义：每 mL 血清（浆）每分钟产生 1 $\mu\text{g NH}_3\text{-N}$ 定义为一个酶活力单位。

UE 活力 ($\mu\text{g/min/mL}$) = $(\Delta A - 0.0373) \div 0.0915 \times 10 \times V$ 反总 $\div V$ 样 $\div T = 27.32 \times (\Delta A - 0.0373)$

2、组织、细菌或细胞中 1 $\mu\text{g NH}_3\text{-N}$ 活力的计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟产生 1 $\mu\text{g NH}_3\text{-N}$ 定义为一个酶活力单位。

UE 活力 ($\mu\text{g/min/mg prot}$) = $(\Delta A - 0.0373) \div 0.0915 \times 10 \times V$ 反总 $\div (V \text{ 样} \times C_{\text{pr}}) \div T$

$$= 27.32 \times (\Delta A - 0.0373) \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟产生 1 $\mu\text{g NH}_3\text{-N}$ 定义为一个酶活力单位。

UE 活力 ($\mu\text{g/min/g 鲜重}$) = $(\Delta A - 0.0373) \div 0.0915 \times 10 \times V$ 反总 $\div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$

$$= 27.32 \times (\Delta A - 0.0373) \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 1 $\mu\text{g NH}_3\text{-N}$ 定义为一个酶活力单位。

UE 活力 ($\mu\text{g/min}/10^4 \text{ cell}$) = $(\Delta A - 0.0373) \div 0.0915 \times 10 \times V$ 反总 $\div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.0546 \times \Delta A$



QQ 1019057849

10: 稀释倍数; T: 反应时间, 60min; V 反总: 反应体系总体积: 0.3mL; V 样:
加入反应体系中样本体积, 0.02mL; V 样总: 提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白质浓度,
mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。



b.用 96 孔板测定的计算公式如下

标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.04575x + 0.0373$; x 为标准品浓度 ($\mu\text{g/mL}$), y 为吸光值

A.

1、血清（浆）UE 活力的计算:

单位的定义: 每 mL 血清（浆）每分钟产生 $1 \mu\text{g NH}_3\text{-N}$ 定义为一个酶活力单位。

$$\text{UE 活力} (\mu\text{g/min/mL}) = (\Delta A - 0.0373) \div 0.04575 \times 10 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 54.64 \times (\Delta A - 0.0373)$$

2、组织、细菌或细胞中 $1 \mu\text{g NH}_3\text{-N}$ 活力的计算:**(1) 按样本蛋白浓度计算:**

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟产生 $1 \mu\text{g NH}_3\text{-N}$ 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{UE 活力} (\mu\text{g/min/mg prot}) &= (\Delta A - 0.0373) \div 0.04575 \times 10 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \\ &\div T \\ &= 54.64 \times (\Delta A - 0.0373) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织每分钟产生 $1 \mu\text{g NH}_3\text{-N}$ 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{UE 活力} (\mu\text{g/min/g 鲜重}) &= (\Delta A - 0.0373) \div 0.04575 \times 10 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}}) \\ &\div V_{\text{样总}} \div T \\ &= 54.64 \times (\Delta A - 0.0373) \div W \end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 $1 \mu\text{g NH}_3\text{-N}$ 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{UE 活力} (\mu\text{g/min}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A - 0.0373) \div 0.04575 \times 10 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}}) \\ &\div V_{\text{样总}} \div T \\ &= 0.1092 \times \Delta A \end{aligned}$$

10: 稀释倍数; T: 反应时间, 60min; V_{反总}: 反应体系总体积: 0.3mL; V_样: 加入反应体系中样本体积, 0.02mL; V_{样总}: 提取液体积, 1mL; C_{pr}: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。