

## 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  $\text{NH}_3\text{-N}$ 。

**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 ( $10^4$  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 (μg/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 μg NH<sub>3</sub>-N 定义为一个酶活力单位。

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

- 2、组织、细菌或细胞中 1 μg NH<sub>3</sub>-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 μg NH<sub>3</sub>-N 定义为一个酶活力单位。

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

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

- (2) 按样本鲜重计算:

单位的定义：每 g 组织每分钟产生 1 μg NH<sub>3</sub>-N 定义为一个酶活力单位。

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

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

- (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 μg NH<sub>3</sub>-N 定义为一个酶活力单位。

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

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。



Lifemall.asia

To be with you

**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。

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

**(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;  $V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积: 0.3mL;  $V_{\text{样}}$ : 加入反应体系中样本体积, 0.02mL;  $V_{\text{样总}}$ : 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。