

脲酶 (Urease, UE) 测定试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

注 意：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。

2、酶促反应

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

混匀, 放入 37°C 水浴 1h 后, 10000g 25°C 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 1μg NH₃-N 定义为一个酶活力单位。

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

单位的定义: 每天每 g 土样中产生 1μg NH₃-N 定义为一个酶活力单位。

2、组织、细菌或细胞中 1μg NH₃-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 1μg NH₃-N 定义为一个酶活力单位。

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 1μg NH₃-N 定义为一个酶活力单位。

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 1μg NH₃-N 定义为一个酶活力单位。

UE 活力 (μg/min/10⁴ 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。

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 (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 1μg NH₃-N 定义为一个酶活力单位。

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

单位的定义: 每天每 g 土样中产生 1μg NH₃-N 定义为一个酶活力单位。

2、组织、细菌或细胞中 1μg NH₃-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 1μg NH₃-N 定义为一个酶活力单位。

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

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

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

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。