

脲酶（Urease, UE）测定试剂盒说明书

(货号: BP10359F 分光法 24 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

脲酶 (UE; EC 3.5.1.5) 是一种含镍的寡聚酶, 特异性地催化尿素水解释放出氨和二氧化碳。脲酶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。

本试剂盒利用靛酚蓝比色法测定脲酶水解尿素产生的 $\text{NH}_3\text{-N}$, 其在强碱性介质中与次氯酸盐和苯酚反应, 生成水溶性染料靛酚蓝, 其深浅与溶液中的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量呈正比, 该物质在 578nm 有最大光吸收, 其深浅与溶液中的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量呈正比, 进而得出脲酶活力大小。

二、测试盒组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 3mL 蒸馏水, 充分溶解, 用不完的试剂 4℃ 保存。
试剂三	液体 13mL×1 瓶	4℃ 避光保存	
试剂四	液体 7mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂五	A: 液体 7mL×2 瓶 B: 液体 1 支	4℃ 避光保存	1. 临用前取 60μL 的 B 液进一瓶 A 液中, 混匀后作为试剂五使用; 2. 混匀后的试剂五一周内用完。
标准品	液体 1 mL×1 支	4℃ 保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

- ① 组织样本: 称取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 冰浴匀浆, 12000rpm, 4℃ 离心 10min, 取上清液待用。

【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 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 提取液, 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 4℃ 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 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、检测步骤:

- ① 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 578nm, 蒸馏水调零。
- ② 在 EP 管依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本上清液	20	20
试剂一	190	190
试剂二	90	
蒸馏水		90
混匀，放入 40℃ 水浴锅或恒温培养箱中孵育 1h		

③ 显色反应：在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
②步反应混合液	60	60
蒸馏水	180	180
试剂三	240	240
试剂四	120	120
试剂五	240	240
充分混匀，37℃放置 20min 后，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 578nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

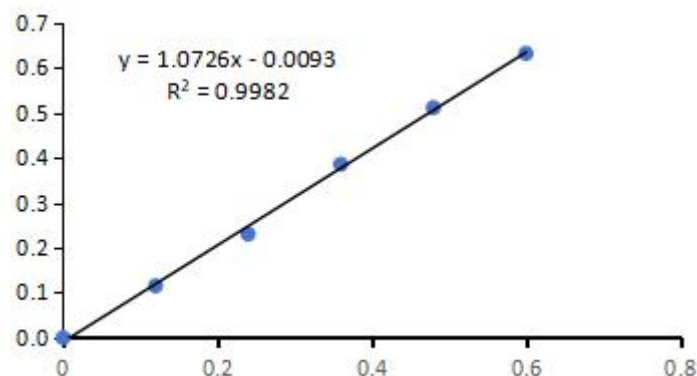
【注】1. 试剂三和四和五需分开加，不能事先混合。

2. 若 ΔA 值较小，可增加取样质量 W（如 0.2g 或更多）或在②步中增加样本加样体积 V1（如增至 50μL，则试剂一相应减少），或在③步显色反应阶段增加上清液量 V2（如增至 100μL，则蒸馏水体积相应减少）；则改变后的 W 和 V1 和 V2 需代入计算公式重新计算。

3. 若 A 测定值大于 1.8，可在③步阶段减少上清液量 V2（如减至 30μL，则蒸馏水体积相应增加）；或用蒸馏水稀释③步检测用到的上清液，则改变后的 V2 和稀释倍数 D 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程为 $y = 1.0726x - 0.0093$ ；x 为标准品质量（μg），y 为吸光值 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟产生 1μg 的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{脲酶(UE)}(\mu\text{g/min/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0093) \div 1.0726] \times (V_3 \div V_2) \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T \times D \\ &= 3.9 \times (\Delta A + 0.0093) \div C_{\text{pr}} \times D \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟产生 1μg 的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{脲酶(UE)}(\mu\text{g/min/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0093) \div 1.0726] \times (V_3 \div V_2) \div (W \times V_1 \div V) \div T \times D \\ &= 3.9 \times (\Delta A + 0.0093) \div W \times D \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算：

酶活定义：每 10^4 个细胞每分钟产生 1μg 的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 定义为一个酶活力单位。

$$\text{脲酶(UE)} (\mu\text{g}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0093) \div 1.0726] \times (V_3 \div V_2) \div (500 \times V_1 \div V) \div T \times D \\ = 0.008 \times (\Delta A + 0.0093) \times D$$

5、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟产生 1 μg 的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 定义为一个酶活力单位。

$$\text{脲酶(UE)} (\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0093) \div 1.0726] \times (V_3 \div V_2) \div V_1 \div T \times D = 3.9 \times (\Delta A + 0.0093) \times D$$

V---提取液体积，1mL；

V1---②步反应体系中样本加样体积，0.02mL；

V2---③步显色阶段上清液体积，0.06mL；

V3---②步反应总体积，0.3mL；

T---反应时间，60min；W---样本质量，g； 500---细胞数量； D---稀释倍数，未稀释即为 1；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

1 标准品母液浓度为 1mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0,2,4,6,8,10. $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

1. 吸取标准品母液 100 μL ，加入 900 μL 蒸馏水，混匀得到 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标品稀释液；						
2. 吸取 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标品稀释液 100 μL ，加入 900 μL 蒸馏水，混匀得到 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标品稀释液待用。						
标品浓度 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0	2	4	6	8	10
标品稀释液 μL	0	40	80	120	160	200
水 μL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据显色反应阶段测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	60	
蒸馏水	180	240
试剂三	240	240
试剂四	120	120
试剂五	240	240
充分混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 20min 后，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中，于 578nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A - \text{测定} - 0 \text{ 浓度管}$ 。		