

脲酶（Urease, UE）测定试剂盒说明书

（货号：BP10359W 微板法 48 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 110 mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4℃保存	1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 加入 5mL 蒸馏水，充分溶解，用不完的试剂 4℃保存。
试剂三	液体 6.5mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂四	液体 3mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	A: 液体 3.5mL×2 瓶 B: 液体 1 支	4℃避光保存	1. 临用前取 30 μL 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）、96 孔板、离心管、酶标仪、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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 578nm。
- 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 1 小时。		

③ 显色反应：在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
②步反应混合液	15	15
蒸馏水	45	45
试剂三	60	60
试剂四	30	30
试剂五	60	60
混匀，37℃ 放置 20min 后，于 578nm 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）。		

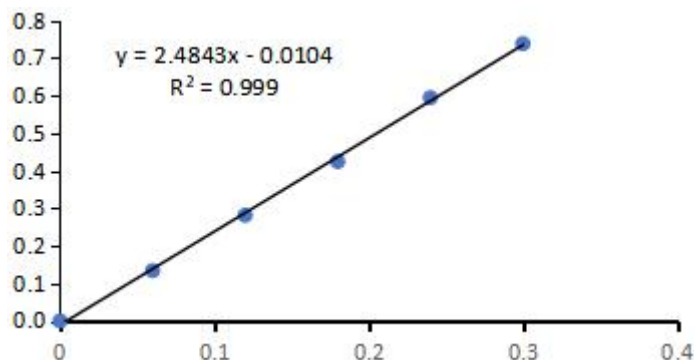
【注】1. 试剂三和四和五需分开加，不能事先混合。

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 30μL，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 1.5，可在③步阶段减少上清液量 V2（如减至 5μL，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 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 2.4843x - 0.0104$ ；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。

$$\begin{aligned} \text{脲酶(UE)活力}(\mu\text{g/min/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0104) \div 2.4843] \times (V_3 \div V_2) \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T \times D \\ &= 6.7 \times (\Delta A + 0.0104) \div C_{\text{pr}} \times D \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{脲酶(UE)活力}(\mu\text{g/min/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0104) \div 2.4843] \times (V_3 \div V_2) \div (W \times V_1 \div V) \div T \times D \\ &= 6.7 \times (\Delta A + 0.0104) \div W \times D \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{脲酶(UE)}(\mu\text{g/min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0104) \div 2.4843] \times (V_3 \div V_2) \div (500 \times V_1 \div V) \div T \times D \\ &= 0.013 \times (\Delta A + 0.0104) \times D \end{aligned}$$

5、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟产生 1μg 的 NH₃-N 定义为一个酶活力单位。

脲酶(UE)活力(μg/min/mL)=[(ΔA+0.0104)÷2.4843]×(V3÷V2)÷V1÷T×D=6.7×(ΔA+0.0104)×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，0.015mL； 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：0,4,8,12,16,20. μg/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 20uL，加入 980uL 蒸馏水，混匀得到 20ug/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μg/mL	0	4	8	12	16	20
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	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	15	
蒸馏水	45	60
试剂三	60	60
试剂四	30	30
试剂五	60	60
充分混匀，37℃放置 20min 后，于 578nm 处读取吸光值 A， ΔA=A 测定-0 浓度管。		