

## 脲酶 (Urease, UE) 测定试剂盒说明书

### 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、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 ( $\mu\text{L}$ )	20	20
试剂一 ( $\mu\text{L}$ )	90	
蒸馏水 ( $\mu\text{L}$ )		90
试剂二 ( $\mu\text{L}$ )	190	190

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 ( $\mu\text{L}$ )	80	80
试剂三 ( $\mu\text{L}$ )	15	15

订购电话: 0512-62956165    技术支持: 18015581827    投诉电话: 18112525205

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 NH<sub>3</sub>-N 定义为一个酶活力单位。

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

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

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

###### (2) 按样本鲜重计算:

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

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

###### (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 NH<sub>3</sub>-N 定义为一个酶活力单位。

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

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。

#### 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 NH<sub>3</sub>-N 定义为一个酶活力单位。

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

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

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

###### (2) 按样本鲜重计算:

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

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

###### (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 1μg NH<sub>3</sub>-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。