

## 脲酶 (Urease, UE) 测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-N015 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、试剂盒组成和配制:

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°C 保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4°C 保存	1. 临用前 8000g 4° C 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°C 保存。
试剂三	液体 6.5mL×1 瓶	4°C 避光保存	
试剂四	液体 3mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂五	A: 液体 3.5mL×2 瓶 B: 液体 1 支	4°C 避光保存	1. 临用前取 30 $\mu\text{L}$ 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°C 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°C 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°C 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:

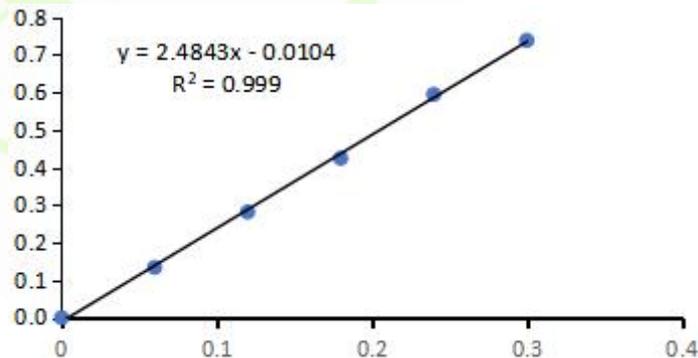
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
②步反应混合液	15	15
蒸馏水	45	45
试剂三	60	60
试剂四	30	30
试剂五	60	60
混匀, 37℃ 放置 20min 后, 于 578nm 读取吸光值 A, ΔA=A 测定管-A 对照管 (每个样本做一个自身对照)。		

【注】1. 试剂三和四和五需分开加, 不能事先混合。

- 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。
- 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 NH<sub>3</sub>-N 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{脲酶(UE)活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0104) \div 2.4843] \times (V3 \div V2) \div (V1 \times C_{\text{pr}}) \div T \times D \\ &= 6.7 \times (\Delta A + 0.0104) \div C_{\text{pr}} \times D \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算:

酶活定义: 每克组织每分钟产生 1μg 的 NH<sub>3</sub>-N 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{脲酶(UE)活力}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0104) \div 2.4843] \times (V3 \div V2) \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 6.7 \times (\Delta A + 0.0104) \div W \times D \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算:

酶活定义: 每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟产生 1μg 的 NH<sub>3</sub>-N 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{脲酶(UE)}(\mu\text{g}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0104) \div 2.4843] \times (V3 \div V2) \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 0.013 \times (\Delta A + 0.0104) \times D \end{aligned}$$

### 5、按液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体每分钟产生 1 $\mu$ g 的 NH<sub>3</sub>-N 定义为一个酶活力单位。

脲酶(UE)活力( $\mu$ g/min/mL)=[( $\Delta$ A+0.0104) $\div$ 2.4843] $\times$ (V3 $\div$ V2) $\div$ V1 $\div$ T $\times$ D=6.7 $\times$ ( $\Delta$ A+0.0104) $\times$ 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, 0.015mL; 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,  $\mu$ g/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 20 $\mu$ L, 加入 980 $\mu$ L 蒸馏水, 混匀得到 20 $\mu$ g/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 $\mu$ g/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 ( $\mu$ L)	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 $^{\circ}$ C 放置 20min 后, 于 578nm 处读取吸光值 A, $\Delta$ A=A 测定-0 浓度管。		