

脲酶 (Urease, UE) 测定试剂盒说明书

(货号: G0412F 分光法 24 样)

一、产品简介:

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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
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 g×1 瓶	4℃ 保存	用前甩几下或 4℃ 离心使试剂落入试管底部, 再加入 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℃ 保存	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 μL ×1 支	4℃ 保存	临用前取 60 μL 的 B 液进一瓶 A 液中, 混匀后作为试剂五使用。混匀后的试剂五一周内用完。
标准品	液体 1 mL×1 支	4℃ 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、水浴锅、离心机、可调式移液器、研钵。

四、脲酶 (UE) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

- 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、上机检测:

- ① 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 578nm, 蒸馏水调零。

- ② 在 EP 管依次加入:

试剂名称 (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:

试剂名称 (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)。		

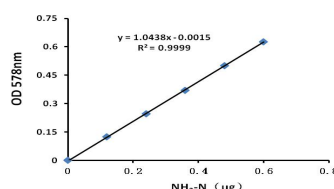
【注】1. 试剂三和四和五需分开加, 不能事先混合。

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 $y = 1.0438x - 0.0015$; 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。

$$\begin{aligned} \text{脲酶(UE)}(\mu\text{g/min/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0015) \div 1.0438] \times (V3 \div V2) \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \times D \\ &= 4 \times (\Delta A + 0.0015) \div \text{Cpr} \times D \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{脲酶(UE)}(\mu\text{g/min/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0015) \div 1.0438] \times (V3 \div V2) \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 4 \times (\Delta A + 0.0015) \div W \times D \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{脲酶(UE)}(\mu\text{g/min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0015) \div 1.0438] \times (V3 \div V2) \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 0.008 \times (\Delta A + 0.0015) \times D \end{aligned}$$

5. 按液体体积计算:

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

$$\text{脲酶(UE)}(\mu\text{g/min/mL}) = [(\Delta A + 0.0015) \div 1.0438] \times (V3 \div V2) \div V1 \div T \times D = 4 \times (\Delta A + 0.0015) \times D$$

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. 把标准品母液 (1mg/mL), 用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 2, 4, 6, 8, 10. μg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。

2. 在③步显色反应阶段, 按照测定管加样表操作, 依据结果即可制作标准曲线。