

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、甲苯（不允许快递）和蒸馏水。

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（10⁴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（ μL ）	20	20
试剂一（ μL ）	90	
蒸馏水（ μL ）		90

试剂二 (μL)	190	190
----------	-----	-----

混匀，放入37°C水浴1h后，10000g 25°C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 (μL)	80	80
试剂三 (μL)	15	15
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 NH₃-N定义为一个酶活力单位。

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

单位的定义：每天每g土样中产生1μg NH₃-N定义为一个酶活力单位。

2、组织、细菌或细胞中1μg NH₃-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 NH₃-N定义为一个酶活力单位。

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

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每g组织每分钟产生1μg NH₃-N定义为一个酶活力单位。

UE活力 (μg/min/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 NH₃-N定义为一个酶活力单位。

UE活力 (μg/min/10⁴ 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 ($\mu\text{g/mL}$), 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 $1\mu\text{g NH}_3\text{-N}$ 定义为一个酶活力单位。

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

单位的定义: 每天每g土样中产生 $1\mu\text{g NH}_3\text{-N}$ 定义为一个酶活力单位。

2、组织、细菌或细胞中 $1\mu\text{g NH}_3\text{-N}$ 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 $1\mu\text{g NH}_3\text{-N}$ 定义为一个酶活力单位。

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

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每g组织每分钟产生 $1\mu\text{g NH}_3\text{-N}$ 定义为一个酶活力单位。

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

(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 $1\mu\text{g NH}_3\text{-N}$ 定义为一个酶活力单位。

$$\text{UE活力 } (\mu\text{g/min/104 cell}) = (\Delta A - 0.0373) \div 0.04575 \times 10 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.1092 \times \Delta A$$

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。