

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 (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 (μL)	20	20
试剂一 (μL)	90	
蒸馏水 (μL)		90
试剂二 (μL)	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 (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。

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

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。

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

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织每分钟产生 1μg NH₃-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 NH₃-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 NH₃-N 定义为一个酶活力单位。

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

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

(2) 按样本鲜重计算:

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

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 $1\mu\text{g NH}_3\text{-N}$ 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; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积: 0.3mL; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中样本体积, 0.02mL; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1mL; C_{pr} : 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。