

Urease Assay Kit

脲酶 (UE) 测定试剂盒说明书

货号: G0412F | 方法: 可见分光法 | 规格: 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 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量成正比, 该物质在 578nm 有最大光吸收, 其深浅与溶液中的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量成正比, 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°C 保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉剂 g×1 瓶	4°C 保存	用前甩几下或 4°C 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°C 保存。
试剂三	液体 13mL×1 瓶	4°C 保存	避光保存。
试剂四	液体 7mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂五	A: 液体 7mL×2 瓶 B: 液体 μL ×1 支	4°C 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°C 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°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、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：

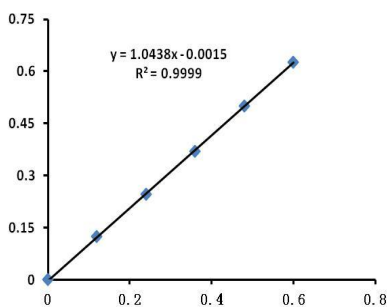
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
②步反应混合液	60	60
蒸馏水	180	180
试剂三	240	240
试剂四	120	120
试剂五	240	240

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）。

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

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 。



标准曲线示意图

说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

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。

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

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。

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

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。

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

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。

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

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。

