

脲酶（UE）检测试剂盒（微量法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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 $\text{NH}_3\text{-N}$ 。

试剂组成和配制：

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。

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 (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) = $(\Delta A - 0.0373) \div 0.04575 \times 10 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 54.64 \times (\Delta A - 0.0373)$

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 (μg/min/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 1μg NH₃-N 定义为一个酶活力单位。

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

(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 1μg NH₃-N 定义为一个酶活力单位。

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

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。