

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0917

Size: 50T/24S

脲酶 (UE) 检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定原理:

A 脲酶 (UE) 广泛分布于植物的种子中, 也存在于动物的血液和尿液中, 某些微生物也能分泌脲酶。UE 能够水解尿素产生氨和碳酸, 对尿素转化起关键作用。利用靛酚蓝比色法测定脲酶水解尿素产生的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 来反应 UE 活性。

二、需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、天平、研钵/匀浆器、低温离心机、1ml 玻璃比色皿、恒温水浴锅。

三、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 30mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂一	粉剂 × 1 瓶	4°C 保存	临用前加 6mL 蒸馏水充分溶解
试剂二	液体 25mL × 1 瓶	4°C 避光保存	
试剂三 A 液	液体 1mL × 1 支	4°C 保存	
试剂三 B 液	液体 4mL × 1 瓶	4°C 保存	临用前将 A 液倒入 B 液中混合, 待用
试剂四	液体 5mL × 1 瓶	4°C 保存	
标准品	液体 1mL × 1 支	4°C 保存	1mg/mL 氮标准液

四、操作步骤：

● 样品处理

1. 组织：按照质量 (g) : 提取液体积 (mL) 为 1:5-10 的比例 (建议称取约 0.1g, 加入 1mL 提取液) 冰上匀浆后于 4°C, 12000g 离心 15min, 取上清待测。

2. 细胞/细菌：按照细胞/细菌数量 (10^4 个) : 提取液体积 (mL) 为 500-1000: 1 的比例 (建议 500 万个细胞加入 1mL 提取液), 冰浴超声波破碎 (功率 300w, 超声 3 s, 间隔 7 s, 总时间 3min); 然后 4°C, 12000g 离心 15min, 取上清置于冰上待测。

3. 血清 (浆) 或其它液体：直接检测。

● 测定操作：

1、可见分光光度计预热 30min, 波长调至 630nm, 蒸馏水调零。

2、将 1mg/mL 氮标准液用蒸馏水稀释至 2 μ g/mL 备用。

3、加样表：

试剂名称 (μ L)	空白管	标准管	测定管	对照管
样品	-	-	100	100
蒸馏水	-	-	-	200
试剂一	-	-	200	-
试剂二	-	-	400	400
充分混匀, 于 37°C 反应 1h,				
反应混合液	-	-	400	400
蒸馏水	400	-	-	-
标准液	-	400	-	-
试剂三	80	80	80	80
试剂四	60	60	60	60

混匀，室温静止 20min。				
蒸馏水	460	460	460	460
充分混匀后测定 630nm 处吸光值，记为 A 空白管、A 标准管、A 测定管和 A 对照管。 计 算 ΔA 标准=A 标准管-A 空白管， ΔA 测定=A 测定管-A 对照管。				

五、计算公式：

1、液体中 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。

$$\text{UE (U/mL)} = \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \times C \text{ 标准品} \times V \text{ 酶促} \div V \text{ 样} \div T = 0.233 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准}。$$

2、组织、细菌或细胞中 UE 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。

$$\begin{aligned} \text{UE 活力 (U/mg prot)} &= \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \times C \text{ 标准品} \times V \text{ 酶促} \div (V \text{ 样} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 0.233 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div C_{\text{pr}}。 \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{UE 活力 (U/g 鲜重)} &= \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \times C \text{ 标准品} \times V \text{ 酶促} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 提取}) \div T \\ &= 0.233 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W。 \end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 百万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。

$$\begin{aligned} \text{UE 活力 (U / } 10^6 \text{ cell)} &= \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \times C \text{ 标准品} \times V \text{ 酶促} \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 提取}) \\ &\div T = 0.233 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div \text{细胞数量}。 \end{aligned}$$

C 标准液: 标准液浓度, $2\mu\text{g/mL}$; T: 反应时间, 60min; V 酶促: 酶促反应体系总体积, 0.7mL;
V 样: 加入反应体系中样本体积, 0.1mL; V 提取: 提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL;
W: 样本质量, g; 细胞数量: 以百万计。

六、注意事项:

ΔA 测定大于 1 时, 建议将反应混合液用蒸馏水稀释或者样品用蒸馏水稀释后再进行测定。