

尿素酶活性检测试剂盒(显色法)

产品编号	产品名称	包装
S0577S	尿素酶活性检测试剂盒(显色法)	100次

产品简介:

- 碧云天的尿素酶活性检测试剂盒(显色法) (Urease Activity Assay Kit, Colorimetric), 又称脲酶活性检测试剂盒, 是一种基于靛酚法, 通过吸光度检测, 快速、灵敏地检测血清、血浆、尿液等各种生物体液、组织、细胞以及组织或细胞培养上清样品、纯化的酶、土壤等样品中尿素酶活性的试剂盒。
- 尿素酶(Urease, EC3.5.1.5), 又称脲酶、大豆脲酶, 是一种含有二价镍离子的高分子量金属酶, 能特异性催化尿素水解为二氧化碳和氨, 在功能上属于酰胺水解酶和磷酸三酯酶超家族[1-2]。尿素酶存在于许多细菌、真菌、藻类、植物和一些无脊椎动物中。尿素酶通常可与肝性脑病/肝昏迷、感染性尿路结石和消化性溃疡有关。感染所致的尿路结石为鸟粪石($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)和碳酸磷灰石[$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \cdot \text{CO}_3$]的混合物。这些多价离子是可溶性的, 但在尿素水解过程中当微生物尿素酶产生氨时会析出, 因为氨的产生会使周围环境pH从大约6.5增加到9, 这种环境的碱化可导致结石结晶形成[3]。许多胃肠道或泌尿道病原体都能产生尿素酶, 因此尿素酶的检测成为诊断病原体的重要手段。
- 本试剂盒检测原理如图1所示。在尿素酶的催化作用下, 尿素水解生成二氧化碳(CO_2)和氨气(NH_3), 生成的氨气和次氯酸盐(OCl^-)形成氯胺(Monochloramine), 氯胺进一步与酚(Phenol)反应形成蓝色的吲哚酚(Indophenols)。吲哚酚在670nm左右有最大吸收峰, 吲哚酚的生成量与样品中尿素酶的活性成正比, 这样通过670nm处的吸光度检测就可以非常灵敏地检测尿素酶的酶活性。

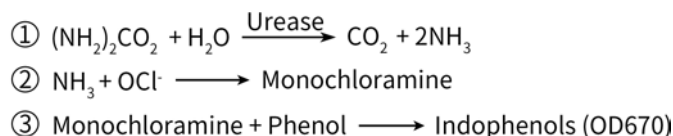


图1. 碧云天尿素酶活性检测试剂盒(显色法) (S0577)检测原理图。

- **本试剂盒检测灵敏度高, 线性范围宽, 样品用量少。**本试剂盒在样品体积为10 μl 时可以检测低至约2mU/ml的尿素酶, 在0.002-0.167U/ml (2-167mU/ml)范围内有良好的线性关系。本试剂盒提供了尿素酶催化生成的产物氨标准溶液(NH_4Cl Standard), 可以通过设置标准曲线(图2), 计算出样品中尿素酶活力。通常0.5-10 μl 细胞或组织裂解液样品足够用于尿素酶的活性检测。

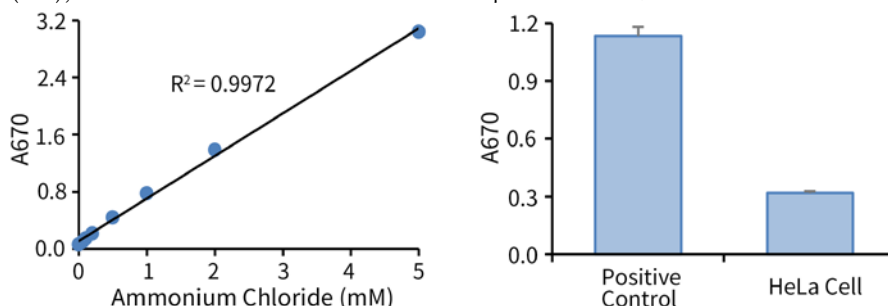


图2. 碧云天尿素酶活性检测试剂盒(显色法) (S0577)对氯化铵标准品、阳性对照、HeLa细胞裂解液样品的检测效果图。10 μl 各浓度的氯化铵标准品及阳性对照、HeLa细胞裂解液样品, 加入90 μl 尿素酶检测工作液混匀后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30分钟, 再依次加入50 μl Detection Reagent A、100 μl Detection Reagent B, 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30分钟, 测定A670。左图为本试剂盒对氯化铵标准品的检测效果图, 在0.05-5mM浓度范围内有良好的线性关系; 右图为本试剂盒检测阳性对照(Positive Control)和7 μg 蛋白量的HeLa细胞裂解液样品(HeLa Cell)的信号值。实际检测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- **本试剂盒提供的检测裂解液有一定的通用性。**使用本试剂盒中的BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay裂解获得的细胞或组织样品, 也可以用于碧云天生产的其它代谢类试剂盒中同样使用BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay进行裂解的样品检测, 通用性强; 而且还可用于检测蛋白浓度、进行SDS-PAGE或一些较易溶解蛋白的Western检测。
- **本试剂盒使用灵活, 检测速度快, 适用范围广。**本试剂盒对Assay Buffer、孵育温度和试剂用量等条件进行了优化, 不仅适合少量样品的检测, 也非常适合高通量筛选(High-throughput screening)的自动化操作系统, 可用于小鼠、大鼠、人等的血清、血浆、尿液等生物体液、细胞培养上清以及组织或细胞等样品的检测, 也可用于纯化的尿素酶和土壤中尿素酶活性的检测。对于大多数样品, 全程约1小时即可完成。
- 按照使用说明操作, 用于96孔板检测时, 本试剂盒小包装可以进行100次检测。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
S0577S-1	BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay	20ml
S0577S-2	Urease Assay Buffer	20ml
S0577S-3	Detection Reagent A	5ml
S0577S-4	Detection Reagent B	10ml
S0577S-5	Substrate (10X)	1ml
S0577S-6	Positive Control (10X)	50µl
S0577S-7	NH ₄ Cl Standard (100mM)	100µl
—	说明书	1份

保存条件：

-20℃保存，一年有效。其中Detection Reagent A和Detection Reagent B须避光保存。

注意事项：

- 如果需要检测土壤样品中的尿素酶活性，需自备50mM 乙酸钠(pH5.0)作为提取液。土壤样品的制备、样品和样品背景对照的设置以及尿素酶活性的计算都比较特殊，与常规的血液、组织和细胞样品存在一定差异，请严格按照说明书中相关说明进行操作和计算。
- Detection Reagent B在空气中不太稳定，开启后应尽快使用，且在使用过程中需注意避光。
- BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay Buffer、Urease Assay Buffer、Detection Reagent A和Detection Reagent B需完全解冻并平衡至室温后再使用，否则会影响检测结果。其它试剂使用时应置于冰上，使用完毕后各试剂应立即按照试剂盒要求的条件保存。
- 如果使用本试剂盒提供的BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay Buffer制备样品，并且加入的样品量在本试剂盒的推荐范围内，可以确保反应体系的pH值在适宜的范围内。如果使用自行配制的裂解液，请确保加入样品后反应体系的pH值在7.0左右，否则可能会影响尿素酶的检测。
- 体积较小的试剂首次使用时建议先离心数秒使液体沉降于管底，然后再混匀使用。结冻的试剂必须完全融化并混匀后使用。
- 血清、细胞等裂解样品如果置于4℃保存，用于尿素酶活性检测时，宜在当天完成检测，否则可能会影响检测结果的准确性。通常细胞或组织裂解样品宜在-20℃保存，-80℃保存更佳。
- Detection Reagent A和Detection Reagent B对人体有害或有刺激性，操作时请小心，并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 样品的准备。

- a. 血液样品的准备：对于血清样品，将全血在常温如25℃下放置30分钟至2小时，不要剧烈摇晃以免溶血，待全血自然凝固并析出血清后，4℃约1000-2000×g离心10分钟，取黄色上清即得血清，注意不要吸取白色或淡黄色沉淀；对于血浆样品，将全血用肝素或者EDTA进行抗凝，4℃约1000-2000×g离心10分钟，取黄色或淡黄色上清即得血浆，注意不要吸取白色沉淀。血清和血浆都需置于冰上，如果不能立即检测，也可以分装并短期保存于-20℃或-80℃。对于冻存的样品，在检测前解冻后冰浴存放备用，使用前必须混匀。
- b. 细胞或组织样品的准备：对于培养的贴壁细胞，PBS (C0221A)洗涤一次并吸净残留液体。对于培养的悬浮细胞，先适当离心(如100-500×g，5分钟)收集细胞到离心管内，弃上清并吸净残留液体。按照每100万细胞加入100-200µl BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay的比例加入裂解液，适当吹打，冰浴5-10分钟以充分裂解细胞。4℃约12,000×g离心3-5分钟，取上清用于后续检测。对于组织样品，按照每10mg组织加入100µl BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay的比例，使用TissueMaster™高通量组织研磨仪(1.5/2ml×48) (E6618)、TissueMaster™手持式组织研磨仪(E6600/E6607)或玻璃匀浆器在约4℃或冰浴等低温条件下进行匀浆。4℃约12,000×g离心3-5分钟，取上清用于后续检测。以上所有操作均需在4℃或冰上操作。制备好的细胞或组织样品如果不能立即检测，可以-20℃或-80℃冻存。
- c. 细胞培养上清样品的准备：对于贴壁细胞，直接取培养液；对于悬浮细胞，离心取培养液。
- d. 土壤样品的准备：本步骤仅供参考，可根据实际情况进行适当的调整和优化，例如适当降低土壤样品的量(其它相关溶液的量也需要相应的降低、实际反应的土壤的重量也需要重新计算)等。
 - (a) 称取**0.1g土壤样品**，加入**2ml 50mM 乙酸钠(pH5.0)**，使用适当的匀浆仪在约4℃或冰浴等低温条件下**匀浆2分钟**。
 - (b) 充分振荡混匀后，取**0.9ml**至一洁净的离心管中作为**样品**；另取**0.2ml**至另一洁净的离心管中作为**样品背景对照**。
 - (c) 在**样品管**中加入**0.1ml的尿素酶检测工作液**(步骤2b)，并在37℃孵育2小时，8000×g离心1分钟；**样品背景对照管**直接在8000×g离心1分钟。样品管和样品背景对照管分别取0.1ml上清液并加入到96孔板的样品孔和样品背景对照孔中，直接转步骤3e。

注：土壤样品中尿素酶的活性可能比较低，为确保活性在检测范围内，建议进行多个孵育时间的测试，孵育时间可以从1小时到24小时不等。

2. 试剂盒的准备。

- a. 将BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay Buffer、Urease Assay Buffer、Detection Reagent A和Detection Reagent B平衡至室温后分别混匀备用。其它试剂存放于冰浴备用，使用完毕后宜立即按照试剂盒要求的条件保存。
- b. 尿素酶检测工作液(Urease Working Solution)的配制：按照每个样品需90μl尿素酶检测工作液的比例配制适量的尿素酶检测工作液。均匀混合81μl Urease Assay Buffer、9μl Substrate (10X)，即可配制成90μl尿素酶检测工作液。根据待检测样品(不包括标准品和样品背景对照孔)的数量，配制适量的尿素酶检测工作液。具体配制方法参考下表。配制好的尿素酶检测工作液可以短暂冰浴避光保存，1小时内较为稳定，但建议尽量现配现用。

Samples	1	10	20	50
Urease Assay Buffer (μl)	81	810	1620	4050
Substrate (10X) (μl)	9	90	180	450
Urease Working Solution (μl)	90	900	1800	4500

3. 样品测定。

- a. 氯化铵标准曲线的设置。
取10μl NH₄Cl Standard (100mM)，加入190μl Urease Assay Buffer，混匀，配制成浓度为5mM氯化铵标准溶液。分别取5mM氯化铵溶液0、0.2、0.4、1、2、4、10μl加入96孔板的标准品孔中，并相应地用Urease Assay Buffer补足至10μl，此时，标准曲线的浓度分别为0、0.1、0.2、0.5、1、2、5mM (用于常规样品的计算)，对应的摩尔数分别为0、1、2、5、10、20、50nmol (用于土壤样品的计算)。
- b. 阳性对照的设置。取适量的Positive Control (10X)，按照1:9的比例加入Urease Assay Buffer将其稀释成1X，例如取Positive Control (10X) 2μl，加入Urease Assay Buffer 18μl，混匀即得20μl的Positive Control (1X)。用作阳性对照时，每孔使用10μl。
- c. 取1-10μl样品或稀释后的样品到96孔板样品孔(Sample)和样品背景对照中，并加入Urease Assay Buffer补足到10μl。同时设置仅含Urease Assay Buffer的孔为空白对照(Blank Control)。
注1：为确保数值在标准曲线范围内，建议进行预实验将样品同时设定多个稀释倍数，以确定样品的大致浓度。如果数值不在标准曲线范围内，可调整样品的稀释倍数或者样品的量。此处的样品总稀释倍数记为n (例如本步骤中对样品进行了5倍稀释，加入的 ‘稀释后的样品’ 为2μl，则n=5×10/2=25)。
注2：对于血清、组织裂解液上清等复杂样品，建议将适当样品设置多个稀释倍数进行预实验，在适当的稀释倍数时，样品的信号值和样品中的蛋白量通常会呈现出良好的线性关系。再根据预实验的结果，选取适宜的稀释倍数用于后续的测定，否则即使信号值在标准曲线的线性范围内，也可能无法得到理想的检测结果。
注3：土壤样品和样品背景对照的设置参照步骤1d (c)。
- d. 样品孔、空白对照孔和阳性对照孔各孔加入90μl尿素酶检测工作液，标准品孔和样品背景对照孔各孔加入90μl Urease Assay Buffer。混匀，37℃孵育30分钟。
注：对于活性较低的样品，可以适当延长孵育时间至60分钟到2小时。
- e. 各孔(包括样品孔、样品背景对照孔、空白对照孔、阳性对照孔和标准品孔)加入50μl Detection Reagent A，混匀。
- f. 各孔(包括样品孔、样品背景对照孔、空白对照孔、阳性对照孔和标准品孔)再加入100μl Detection Reagent B，混匀，37℃避光孵育30分钟。
- g. 在670nm测定吸光度。
- h. 尿素酶活性的计算。
 - (a) 常规样品中尿素酶活性的计算：建立氯化铵标准曲线(摩尔浓度，单位为mM)，并计算反应时间内样品中尿素酶催化产生的铵根离子的量A。氯化铵标准曲线可以参考图2，在0.05-5mM范围内有良好的线性关系。
$$\text{Urease Activity (U/ml)} = A \times n / T$$

注：A为步骤3h (a)根据标准曲线确定的铵根离子的浓度(mM)；
n为步骤3c样品总稀释倍数；
T为步骤3d的反应时间(min)；
尿素酶活力单位的定义：1个酶活力单位(unit, U)在37℃，pH7.0的条件下，每分钟内可以催化生成1μmol氨。
 - (b) 土壤样品中尿素酶活性的计算：建立氯化铵标准曲线(摩尔数，单位为nmol)，并计算反应时间内样品中尿素酶催化产生的铵根离子的量B。
$$\text{Urease Activity (nmol/mg soil/hour)} = B / (T \times 5)$$

注：A为步骤3h (b)根据标准曲线确定的铵根离子的摩尔数(nmol)；
5为实际反应的土壤的重量约5mg；
T为步骤1d的反应时间(hours)。

参考文献：

1. Holm L, Sander C. Proteins. 1997. 28(1):72-82.
2. Krajewska B, van Eldik R, Brindell M. J Biol Inorg Chem. 2012. 17(7):1123-1134.
3. Mobley HL, Hausinger RP. Microbiol Rev. 1989. 53(1):85-108.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C0016/C0017	乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒	100次/500次
C0018	乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(WST-8法)	100次/500次
C0019	乳酸脱氢酶释放检测试剂盒(WST-8法)	100次/500次
S0110S	黄嘌呤氧化酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0111S	黄嘌呤氧化酶抑制剂筛选试剂盒(WST-8法)	100次
S0112	Amplex Red黄嘌呤氧化酶活性检测试剂盒	100次/500次
S0113S	Amplex Red黄嘌呤氧化酶抑制剂筛选试剂盒	100次
S0114S	黄嘌呤/次黄嘌呤检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0183S	果糖-6-磷酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0185	G6P检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0187S	磷酸葡萄糖异构酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0189	G6PDH活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0201	葡萄糖检测试剂盒(O-toluidine法)	200次/1000次
S0202	葡萄糖检测试剂盒(GOD/POD显色法)	100次/500次
S0204S	D-乳酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0208S	L-乳酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0211	Amplex Red胆固醇与胆固醇酯检测试剂盒	100次/500次
S0215	Amplex Red游离脂肪酸检测试剂盒	100次/500次
S0219	Amplex Red甘油三酯检测试剂盒	100次/500次
S0223	Amplex Red甘油检测试剂盒	100次/500次
S0227S	Amplex Red L-乳酸检测试剂盒	100次
S0231S	Amplex Red尿酸与尿酸酶检测试剂盒	100次
S0235S	Amplex Red磷酸盐检测试剂盒	100次
S0239S	Amplex Red乙醇检测试剂盒	100次
S0240	乙醇检测试剂盒(WST-8法)	100次/500次
S0241	乙醇脱氢酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次/500次
S0243	Amplex Red黄嘌呤/次黄嘌呤检测试剂盒	100次/500次
S0247S	Amplex Red谷氨酸与谷氨酸氧化酶检测试剂盒	100次
S0251S	Amplex Red过氧化氢与过氧化物酶检测试剂盒	100次
S0255S	Amplex Red过氧化氢酶检测试剂盒	100次
S0259S	Amplex Red单胺氧化酶检测试剂盒	100次
S0263S	Amplex Red鞘磷脂酶检测试剂盒	100次
S0267S	Amplex Red胆碱与乙酰胆碱检测试剂盒	100次
S0271S	Amplex Red乙酰胆碱酯酶检测试剂盒	100次
S0275S	Amplex Red磷脂酰胆碱检测试剂盒	100次
S0279S	Amplex Red磷脂酶D检测试剂盒	100次
S0283S	Amplex Red肌酸检测试剂盒	100次
S0287S	Amplex Red肌酸激酶检测试剂盒	100次
S0291S	Amplex Red肌酐检测试剂盒	100次
S0295S	Amplex Red肌氨酸检测试剂盒	100次
S0299S	Amplex Red丙酮酸检测试剂盒	100次
S0303S	Amplex Red丙酮酸激酶检测试剂盒	100次
S0307S	Amplex Red ADP检测试剂盒	100次
S0311S	Amplex Red磷酸烯醇式丙酮酸检测试剂盒	100次
S0315S	Amplex Red丙氨酸检测试剂盒	100次
S0319S	Amplex Red丙氨酸转氨酶检测试剂盒	100次
S0323S	Amplex Red α -酮戊二酸检测试剂盒	100次
S0327S	Amplex Red天冬氨酸检测试剂盒	100次
S0331S	Amplex Red天冬氨酸氨基转移酶检测试剂盒	100次
S0335S	Amplex Red柠檬酸检测试剂盒	100次
S0339S	Amplex Red草酰乙酸检测试剂盒	100次

S0343S	Amplex Red葡萄糖检测试剂盒	100次
S0347S	Amplex Red葡萄糖氧化酶检测试剂盒	100次
S0351S	Amplex Red果糖检测试剂盒	100次
S0355S	Amplex Red乳糖检测试剂盒	100次
S0359S	Amplex Red半乳糖与乳糖检测试剂盒	100次
S0363S	Amplex Red半乳糖与半乳糖氧化酶检测试剂盒	100次
S0367S	Amplex Red麦芽糖检测试剂盒	100次
S0371S	Amplex Red麦芽糖与葡萄糖检测试剂盒	100次
S0375S	Amplex Red糖原检测试剂盒	100次
S0379S	Amplex Red磷酸果糖激酶检测试剂盒	100次
S0383S	Amplex Red乙酰辅酶A检测试剂盒	100次
S0387S	Amplex Red辅酶A检测试剂盒	100次
S0391S	Amplex Red乙酰辅酶A合成酶检测试剂盒	100次
S0511S	L-苹果酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0514S	苹果酸脱氢酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0517S	延胡索酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0520S	延胡索酸酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0523S	异柠檬酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0526S	异柠檬酸脱氢酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0529S	Amplex Red琥珀酸检测试剂盒	100次
S0530S	琥珀酸脱氢酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0532S	Amplex Red琥珀酰辅酶A合成酶检测试剂盒	100次
S0535S	支链氨基酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0538S	N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0540S	酪氨酸检测试剂盒(显色法)	100次
S0542S	酪氨酸酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0545S	酪氨酸酶抑制剂筛选试剂盒(显色法)	100次
S0547S	髓过氧化物酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0548S	Amplex Red髓过氧化物酶活性检测试剂盒	100次
S0550S	Amplex Red髓过氧化物酶抑制剂筛选试剂盒	100次
S0554	葡萄糖摄取检测试剂盒(WST-8法)	100次/500次
S0556	葡萄糖摄取检测试剂盒(DTNB法)	100次/500次
S0561	葡萄糖摄取荧光检测试剂盒(2-NBDG)	10-100次/50-500次
S0565S	乙醛检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0568S	乙醛脱氢酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0571	多酚含量检测试剂盒(显色法)	100次/500次
S0574	尿素检测试剂盒(显色法)	100次/500次
S0577S	尿素酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0580S	多巴胺检测试剂盒(荧光法)	100次
S0584S	总氨基酸检测试剂盒(显色法)	100次
P0321	碱性磷酸酶检测试剂盒	100次/500次
P0322	碱性磷酸酶检测试剂盒(荧光法)	100次/500次
P0326	酸性磷酸酶检测试剂盒	120次
P0327S	酸性磷酸酶检测试剂盒(荧光法)	100次
P0329	胎盘碱性磷酸酶检测试剂盒	100次
P0332	抗酒石酸酸性磷酸酶检测试剂盒	120次
P0335	抗氟离子酸性磷酸酶检测试剂盒	120次
P0392S	D-乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8法)	100次
P0393S	L-乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8法)	100次
P0395S	总乳酸脱氢酶检测试剂盒(WST-8法)	100次
P0405S	α -淀粉酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
P0407S	糖化酶活性检测试剂盒(显色法)	100次

P0421S	细胞色素C氧化酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
--------	----------------------	------

Version 2025.04.22