

黄嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase, XOD) 试剂盒说明书

微量法 100 管/96 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:

XOD (EC 1.17.3.2) 催化黄嘌呤氧化生成尿酸和超氧阴离子, 是活性氧主要来源之一; 同时也是核苷酸代谢的关键酶之一。XOD 主要分布于哺乳动物的心, 肺, 肝脏等组织中, 当肝功能受损时, XOD 大量释放到血清中, 对肝损害的诊断具有特异性的意义。

测定原理:

XOD 催化黄嘌呤产生尿酸, 尿酸在 290nm 下有特征吸收峰。

试剂组成和配制:

产品名称	OX004-100T/96S	Storage
提取液: 液体	100ml	4°C
试剂一: 液体	30ml	4°C
试剂二: 粉剂	2 瓶	4°C
说明书	一份	

需自备仪器和用品:

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板)、研钵、冰和蒸馏水。

粗酶液提取:

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°C 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°C 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 290nm，蒸馏水调零。
- 2、XOD 检测工作液的配制：用时在每瓶试剂二中加入 15ml 试剂一，充分混匀，待用；现配现用；
- 3、测定前将 XOD 检测工作液在 37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）水浴 10min 以上。
- 4、准备 96 孔 UV 板一块（非普通酶标板，普通酶标板只能透过可见光，不能透过紫外光，检测波长小于 340nm 务必使用 UV 板）。
- 5、在微量石英比色皿或 96 孔 UV 板中加入 10 μ l 样本和 250 μ l 工作液，立即混匀并计时，记录 290nm 下初始吸光值 A1 和 1min 后的吸光值 A2。计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

XOD 活性计算：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、血清（浆）XOD 计算：

单位的定义：每毫升血清（浆）每分钟催化产生 1nmol 尿酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{XOD (nmol/min/ml)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 2131 \times \Delta A$$

2、组织、细菌或细胞中 XOD 计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1nmol 尿酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{XOD (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 2131 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟催化产生 1nmol 尿酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{XOD (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2131 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每一万个细菌或细胞每分钟催化产生 1nmol 尿酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{XOD (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 4.26 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积，2.6 $\times 10^{-4}$ L； ϵ ：尿酸摩尔消光系数，1.22 $\times 10^4$ L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.01 ml；V 样总：加入提取液体积，1 ml；T：反应时间，1 min；W：样本质量，g；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/ml；500：细胞或细菌总数，500 万。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准条件下的回归曲线为 $y = 1.2396x + 0.0259$, $R^2 = 0.9977$ ；其中 y 为 ΔA , x 为 NADPH 浓度 nmol/ml

1、血清（浆）中 NADPH 含量计算

$$\text{NADPH 含量 (nmol/ml)} = [(\Delta A - 0.0259) \div 1.2396 \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 16.1 \times (\Delta A - 0.0259)$$

2、组织、细菌或细胞中 NADPH 含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{NADPH (nmol/mg prot)} = [(\Delta A - 0.0259) \div 1.2396 \times V1] \div (V1 \times C_{\text{pr}}) = 0.8 \times (\Delta A - 0.0259) \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

$$\text{NADPH (nmol/g 鲜重)} = [(\Delta A - 0.0259) \div 1.2396 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 1.6 \times (\Delta A - 0.0259) \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

$$\text{NADPH (nmol/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A - 0.0259) \div 1.2396 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.003 \times (\Delta A - 0.0259)$$

V1：加入反应体系中样本体积，0.05ml；V2：加入提取液体积，2ml；V3：加入血清（浆）体积：0.1ml；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/ml；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500 万。

