

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。

需自备的仪器和用品:

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。

试剂组成和配制:

提取液: 100mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂一: 30mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 粉剂×2 瓶, 4℃ 保存。

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℃ 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。

操作步骤:

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℃ (哺乳动物) 或 25℃ (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。

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

(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, 2.6×10^{-4} L; ϵ : 尿酸摩尔消光系数, 1.22×10^4 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

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。

$$\text{XOD (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T = 4262 \times \Delta A$$

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。

$$\text{XOD (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T = 4262 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{XOD (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 4262 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{XOD (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 8.52 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, 2.6×10^{-4} L; ϵ : 尿酸摩尔消光系数, 1.22×10^4 L / mol / cm; d: 96 孔板光径, 0.5cm; 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。