

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 1.1.7.3.2）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（10⁴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10μL样本和250μL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。

$$\text{XOD (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 2131 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{XOD (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2131 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{XOD (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 4.26 \times \Delta A$$

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。

$$\text{XOD (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div V_{\text{样}} \div T = 4262 \times \Delta A$$

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。

$$\text{XOD (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 4262 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{XOD (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 4262 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{XOD (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 8.52 \times \Delta A$$

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。