

比色法测定黄嘌呤氧化酶

吴晓生

李龙官

(镇江医学院检验系)

(上海第二医科大学附属第九医院)

黄嘌呤氧化酶 (Xanthine Oxidase, EC: 1, 2, 3, 2; 简称 XOD) 属需氧脱氢酶类, 是体内核酸代谢中一重要的酶。它由两个分子量为 140,000 的亚基所组成, 每个亚基内含有一个钼原子、两个 $\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{SR})_4$ 原子簇和一个黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD)^[1]。该酶主要存在于哺乳动物的乳汁和肝脏中, 小肠亦含少量^[2]。其测定方法很多, 主要有分光光度法、电化学法、荧光法和放射化学法等^[7]。但均操作烦琐, 仪器设备要求高, 难以推广。本文介绍了一种简单、可靠而适用于一般实验室的 XOD 比色测定法。

方 法

一、原理:

将测定标本分别置 -70°C 保存 1—8 天及 15 天, 再分别测定其发光强度, 发现保存一周内的标本无变化, 超过一周发光值即有下降, 虽减少不多, 但可能影响测定结果。所以标本保存最好不超过一周。此外, 对照观察还表明, 一周内的标本置超低温 (-70°C) 和普通冰箱上层 (-5°C — -10°C) 保存, 其结果无差异。

三、相对最适酶、细胞浓度

通过对比, 我们所选用的最适荧光素酶浓度为 4 毫克/每测定管, 细胞浓度为 $1.5\text{--}2.0 \times 10^6$ /毫升样本。但在测定过程中有时也会因荧光素饱和效应的发生而影响结果分析。所以测定不同细胞时均各有其酶最适浓度和细胞浓度。

小 结

本法使用简便, 测定快速, 结果可靠, 并且

XOD 可催化基质中的次黄嘌呤 (或黄嘌呤) 生成黄嘌呤 (或尿酸), 与此同时产生的超氧离子 (O_2^-) 将硝基四唑蓝还原成紫红色的甲臍。根据甲臍的生成量可推算 XOD 活力。

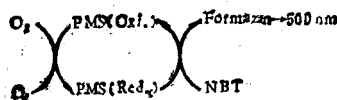
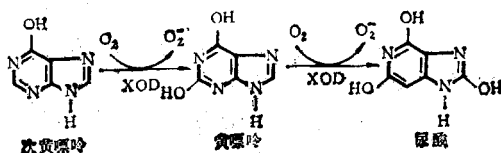


图 1

灵敏度高, 它可测得低达 10^{-12} — 10^{-15} 克分子浓度的 ATP 含量。同时实验结果较稳定, 重复性也较好。

实验中得到江苏省计划生育研究所许宁同志的大力支持, 特致谢意。

参 考 文 献

- [1] Stanley, P. E. and Williams, S. G.: *Anal. Biochem.*, 29: 381, 1969.
- [2] Beutler, E. and Baluda, M. C.: *Blood*, 23: 688, 1964.
- [3] Hammer, J. A.: *Am. Rev. Respir. Dis.*, 124: 50, 1981.
- [4] 柯一保: 《生物科学动态》, 6: 20, 1978.
- [5] Bloom, B. R. and David, J. R.: *In Vitro in Cell-Mediated and Tumor Immunity*, Academic Press, New York, San Francisco, London, 1976.

[本文于 1985 年 12 月 2 日收到]

二、试剂和材料:

1. 空白基质液 pH8.3的 0.1M K₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液。内含 0.2% Triton X-100。

2. 测定基质液 取次黄嘌呤 (Hypoxanthine 简称 HX; 美国 Sigma 公司或上海试剂二厂生产) 34mg 溶于 1000ml 的空白基质液中。冰箱内保存, 可稳定六个月。

3. 反应显色剂 (兼作标准液) 取硝基四唑兰 (NBT; 英国 BDH 或瑞士 Fluka 公司生产, 分子量为 505.71) 100mg 和酚嗪二甲酯硫酸盐 (PMS; 中科院上海生化所生产) 20mg, 溶于 100ml 蒸馏水中。盛于包有黑纸的棕色瓶内。冰箱内保存, 可稳定两个月。

4. 反应终止液 0.35M HCl。

5. NADH 溶液 取还原型辅酶 I (NADH; 西德 Boehringer Mannheim 公司或中科院上海生化所生产) 100mg 溶于 10ml 蒸馏水中, 盛于棕色瓶内。冰箱内保存, 可稳定一个月。

6. 测定标本 (兔肝脏匀浆) 取兔肝, 剪碎后加等体积生理盐水, 充分研磨, 3000rpm 离心 10', 取上清液置冰箱内备用。

三、操作步骤:

见表 1

表 1 XOD 测定步骤

加入物 (ml)	U	B
1:10 稀释标本	0.1	0.1
测定基质液	2.0	—
空白基质液	—	2.0
反应显色剂	0.2	0.2
充分混匀, 37℃ 水浴 15 分钟		
反应终止液	2.0	2.0
充分混匀, 5 分钟后以水调零, 分别测定 500nm 处的吸光度 A _U 、A _B		

$\Delta A = A_u - A_B$ 。根据 ΔA 的值查标准曲线, 即得 XOD 的活力单位。

所有操作均应避免光线直射。

酶单位定义: 37℃ 时, 每分钟使 NBT

表 2 XOD 标准曲线操作步骤

加入物 (ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
测定基质液	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
反应显色剂	0.00	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.12	0.14	0.16	0.18	0.20
NADH 溶液	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
蒸馏水	2.20	2.18	2.16	2.14	2.12	2.10	2.08	2.06	2.04	2.02	2.00
充分混匀, 以 1 管调零, 在 500nm 处测定各管吸光度											
相当于 XOD 的活力 (U/dL)	0	26.4	52.8	79.1	105.4	131.8	152.2	184.6	210.9	237.2	263.6

1μMol 还原成甲臌的酶量为 1 个单位。

四、标准曲线:

按表 2 所列程序进行操作:

以活力单位为横座标, 吸光度为纵座标, 绘制标准曲线。

单位的推算:

$$U/dL = \frac{\text{显色剂用量 (ml)} \times \text{显色剂浓度 (mg/ml)} \times 1000 \times 1000}{\text{NBT 的分子量} \times 0.1 \times 15}$$
$$= \text{显色剂用量} \times 1318$$

结果与讨论

一、标准曲线

按上述操作绘出标准曲线 (图 2), 但如果用 0.35M HCl 终止反应时, 见随着时间的延长在 500nm 处和 340nm 处的吸光度均逐渐下降, 这可能因为 NBT 与 NADH 在酸性条件下是一个可逆反应。用水代替 0.35M HCl 后, 吸光度稳定不变。

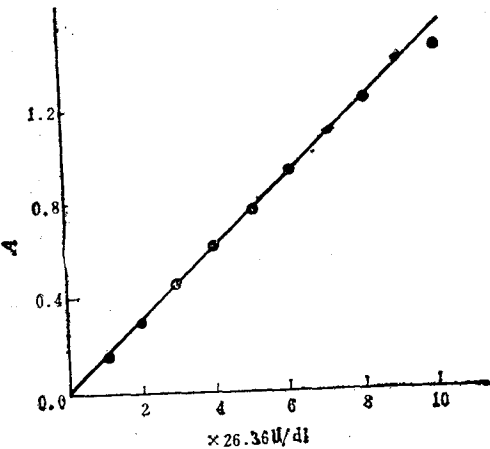


图 2 酶活力标准曲线

二、最大吸收峰

关于甲臍的最大吸收峰各家说法不一^[3-6], 本文用岛津 UV-240 型双光束分光光度计分别对测定管和空白管进行波长扫描, 见最大吸收峰在 500nm 处(图 3)。

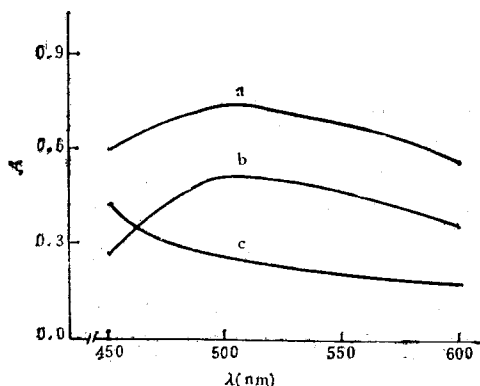


图 3 最大吸收峰测定曲线

- a: 测定管对水的扫描曲线
- b: 测定管对空白管的扫描曲线
- c: 空白管对水的扫描曲线

三、米氏常数

分别以 0.125、0.250、0.375、0.500、0.625 mM/L 等不同浓度的次黄嘌呤基质进行米氏常数测定, 按赖氏法作图(图 4), 得 XOD 的米氏常数为 7.7×10^{-5} Mol/L, 同时基质中的 HX 的浓度以 0.25mM/L 较为合适。

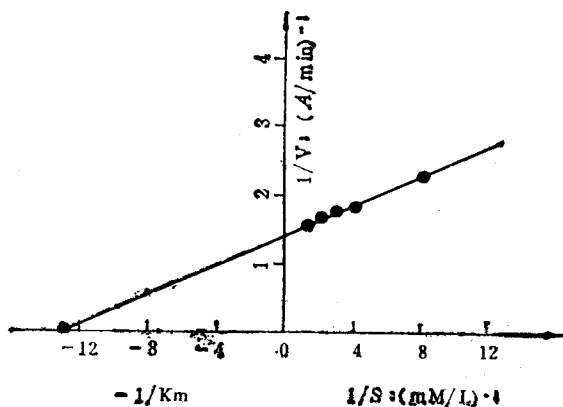


图 4 米氏方程曲线

四、最适 pH

用 pH7.7 ~ 8.9 的不同 pH 的 PBS 配制

基质液和空白液, 对酶的活力观察, 见 pH8.3 时酶表现出最大活力。

五、保护剂的选择

由于甲臍在水中溶解度很小, 为此 Nachlas 等人提出在反应液中加入明胶作为保护剂, 使其形成一种均匀、稳定的胶体溶液^[8], 花田氏等用 1% SDS^[3], 而 Nishikawa 等用 Triton X-100^[4]。据本文观察, 用明胶配的基质液容易生长细菌, 用 SDS 配制的基质测定时吸光度偏低, 以 Triton X-100 为首选。

六、酶作用时间

取三份不同标本按本法操作, 分别在反应开始后 5、10、15、20、25、30 分钟时终止反应, 测定其吸光度, 以 15 分钟时为最佳反应时间。

七、标本稀释试验:

用一份标本进行不同浓度的稀释, 再按本法操作测定 A 值。结果显示线性关系良好(图 5)。

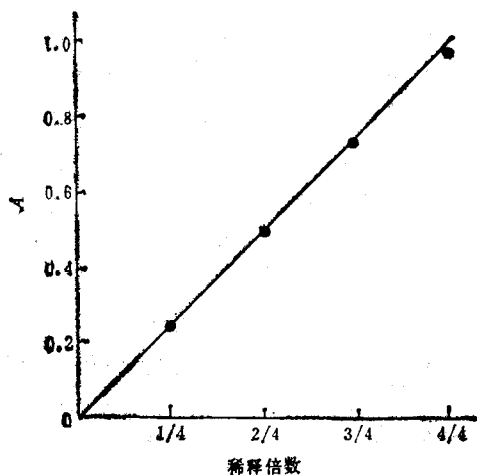


图 5 不同酶浓度的线性曲线

八、显色的稳定性:

在避免强光直射时, 标准管、测定管、空白管的吸光度在 24 小时之内稳定不变。

九、干扰试验

本法的空白管的吸光度偏高, 这可能由一些含巯基的化合物和维生素 C 所引起的非特异性还原反应^[9], 为此我们在空白管中加入还原

(下转第70页)

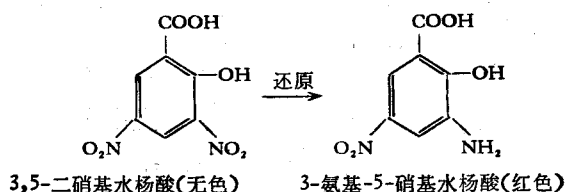
用 比 色 法 测 定 果 糖

蒋 立 科 唐 鑫 生

(徽州师范专科学校, 安徽屯溪市)

果糖是生物组织里一种重要的糖类, 是衡量水果、甘蔗、甜菜等甜度的重要指标。生产上测定果糖都是用测定还原糖的碘量法, 但常因测定体积过大或果糖含量低造成误差, 而且重复性不好。本文报道作者以比色法代替碘量法, 经过多年实际应用表明, 比色法操作快速、计算简便, 结果准确, 适合生产上大量样品的测定。

的单糖和双糖叫还原糖。还原糖能使 3, 5-二硝基水杨酸还原成棕色的 3-氨基-5-硝基水杨酸^[1]。后者用分光光度计测定。



但含有果糖的样品, 也伴随葡萄糖的存在, 因此, 测定果糖需在碱性条件下先将葡萄糖氧化。我们采用波钦诺克方法^[2]氧化葡萄糖。

一、方法原理

含有自由醛基 (-CHO-) 或酮基 (>C=O)

(上接第67页)

型谷胱甘肽、DL-半胱氨酸和维生素 C, 发现三者均能使空白管的吸光度加深(见表 3)。在作最适 pH 研究时还发现 pH 越大, 非特异性还原反应越强, 这点与前人报告的一致^[10]。此外, Roger 认为某些酰胺类化合物亦可使 NBT 还原^[11]。

汁或血清中 XOD 含量测定。

本文承陈燧康教授审阅, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Spence, J. T., et al.: *Biochem.*, 21: 1656—61, 1982.
- [2] 武内忠男、小川和朗著, (朱逢春等译): 《新酶的组织化学》, p. 157—60, 1983.
- [3] 花田寿郎等: 临床检查·机器试薬 (日), VIII (3): 629—35, 1985.
- [4] Nishikawa, Y., et al.: *Clin. Chem.*, 31(1): 103—5, 1985.
- [5] 馆下孝光等: 临床检查·机器试薬 (日), VIII (2): 348—55, 1985.
- [6] 佐佐木 禎一等: 同上, VIII (4): 916—25, 1985.
- [7] Guibault, G. G. 著, (缪辉南、陈石根译): 《酶法分析手册》p. 157—60, 1983.
- [8] Nachlas, M. M., et al.: *J. Biol. Chem.*, 235(2): 499—503, 1960.
- [9] 吴果诚等: 《中华医学检验杂志》, 6(1): 202—5, 1983.
- [10] 杨振华: 《同工酶的测定》, p. 20, 1979.
- [11] Roger, N. J., et al.: *Clin. Chim. Acta*, 127: 87—95, 1983.

表 3 各种物质的干扰反应

加入物(mg/管)	A		
	0	5	10
还原型谷胱甘肽	0.180	0.48	0.62
半 胱 氨 酸	0.175	0.69	0.88
维 生 素 c	0.180	0.82	0.99

十、重复性试验:

用同一份标本同时进行 20 次测定, 其结果为 $1322 \pm 57 (\bar{X} \pm 2SD)$ U/dl, 其批内 CV 为 2.0%。

我们认为, 本法简单、快速、还可适用于乳

[本文于 1986 年 1 月 7 日收到]