

尿酸酶活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

规格：100T/48S

产品内容：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 5 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 4 mL×1 瓶	-20°C保存
试剂三	液体 10 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂四	液体 6 mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	液体 102 μL×1 支	2-8°C保存

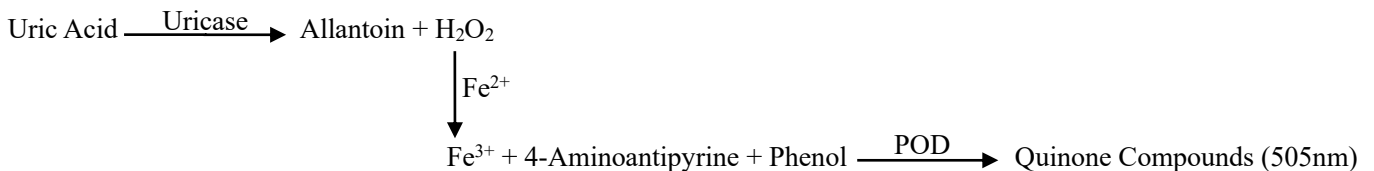
溶液的配制：

- 1、标准品：临用前加入 898 μL 蒸馏水得到 1 mmol/mL 的过氧化氢溶液，2-8°C保存 4 周。
- 2、工作液 A 的配制：按照试剂二：试剂三：**试剂四** = 0.85mL：2.55mL：1.7mL（共 5.1mL，30S）的比例配制，用于样本测定管、空白管及标准管的检测。根据样本量现配现用，配后建议 2 小时内用完（2-8°C 或者冰上保存）。
- 3、工作液 B 的配制：按照试剂二：试剂三：**试剂一** = 0.85mL：2.55mL：1.7mL（共 5.1mL，30S）的比例配制，用于样本对照管的检测。根据样本量现配现用，配后建议 2 小时内用完（2-8°C 或者冰上保存）。

产品说明：

尿酸酶，又名尿酸氧化酶，是一种参与嘌呤降解途径的氧化酶，可以将尿酸分解为尿囊素进而排出体外。尿酸为嘌呤代谢的终末产物，积累过多将导致痛风、肾病、心血管疾病等多种疾病的发生。尿酸酶在尿酸相关疾病的临床检测以及治疗中有着重要意义。

尿酸酶催化尿酸分解为尿囊素、CO₂ 和 H₂O₂，H₂O₂ 氧化亚铁氰化钾中的 Fe²⁺ 生成 Fe³⁺，Fe³⁺ 进一步与 4-氨基安替比林和酚反应生成红色醌类化合物，在 505 nm 处有特征吸收峰，通过测定 505 nm 处的吸光值来反映尿酸酶的活性。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰、EP 管、蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆，然后 10000 rpm，4℃，离心 10 min，取上清置于冰上待测。

细菌或细胞：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 万个细菌或细胞加入 1 mL 提取液），冰浴超声波破碎细菌或细胞（功率 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，总时间 5 min）；然后 10000 rpm，4℃，离心 10 min，取上清置于冰上待测。

二、测定步骤

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 505 nm，分光光度计用蒸馏水调零。
- 2、将 1 mmol/mL 标准液用蒸馏水稀释为 0.5 μmol/mL 的标准溶液备用。标准溶液的稀释：取 20μL 1mmol/mL 过氧化氢标准液，加入 1980μL 蒸馏水，充分混匀，配制成 10μmol/mL 标准液，再取 50μL 10μmol/mL 过氧化氢标准液，加入 950μL 蒸馏水，充分混匀，配制成 0.5μmol/mL 标准液使用，现用现配。（实验中每管需要 30μL，为减小实验误差，故配制大体积）。

3、操作表：（在 1.5 mL 离心管/96 孔板中）

试剂名称（μL）	对照管	测定管	标准管	空白管
样本	30	30	-	-
标准溶液	-	-	30	-
蒸馏水	-	-	-	30
工作液 A	-	170	170	170
工作液 B	170	-	-	-

混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）恒温培养箱中准确反应 30 min。于微量玻璃比色皿/96 孔板，测定 505nm 处吸光值 A，分别记为 A 对照管、A 测定管、A 标准管、A 空白管。计算 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管，ΔA 标准=A 标准管-A 空白管。每个测定管需设一个对照管，标准管和空白管只需测 1-2 次。

三、尿酸酶活性计算

（1）按样本质量计算

酶活定义：在 pH 8.8 的条件下，每克样本每小时分解尿酸产生 1 μmol 的 H₂O₂ 定义为一个酶活力单位。

$$\text{尿酸酶酶活 (U/g 质量)} = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准}) \times V \text{ 样本} \div (W \times V \text{ 样本} \div V \text{ 提取}) \div T$$

$$= \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W$$

（2）按蛋白浓度计算

酶活定义：在 pH 8.8 的条件下，每毫克蛋白每小时分解尿酸产生 1 μmol 的 H₂O₂ 定义为一个酶活力单位。

$$\text{尿酸酶酶活 (U/mg prot)} = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准}) \times V \text{ 样本} \div (Cpr \times V \text{ 样本}) \div T$$

$$= \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div Cpr$$

（3）按照细菌数量或细胞计算

酶活定义：在 pH8.8 的条件下，每 10⁴ 个细菌或细胞每小时分解尿酸产生 1 μmol 的 H₂O₂ 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{尿酸酶酶活 (U/10}^4\text{ cell)} &= \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标准}) \times V \text{ 样本} \div (N \times V \text{ 样本} \div V \text{ 提取}) \div T \\ &= \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div N\end{aligned}$$

C 标准：标准溶液浓度，0.5 $\mu\text{mol/mL}$ ；V 样本：加入的样本体积，0.03 mL；V 提取：提取液体积，1 mL；T：酶促反应时间：0.5 h；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；N：细菌数量（以万计）。

注意事项：

- 1、A 大于 1.5 时，建议将样本用提取液稀释后再进行测定，并在计算时乘以相应的稀释倍数。
- 2、工作液 A 与工作液 B，需根据样本量现配现用，配后建议 2 小时内用完。工作液本身淡黄的，随着时间的延长，会变为红色，如有变色，则视为失效，需重新配制。

实验实例：

- 1、取 0.1g 小鼠肝脏进行样本处理，取上清稀释 4 倍后按测定步骤操作，使用 96 孔板测定计算 $\Delta A \text{ 测定} = A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管} = 0.804 - 0.285 = 0.519$ ， $\Delta A \text{ 标准} = A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管} = 0.741 - 0.051 = 0.690$ ，按样本质量计算酶活得：
尿酸酶酶活 (U/g 质量) = $\Delta A \div \Delta A \text{ 标准} \div W \times 4$ (稀释倍数) = $0.519 \div 0.690 \div 0.1 \times 4$ (稀释倍数) = 30.09 U/g 质量。