

黄嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase, XOD) 试剂盒说明书

(货号: BP10067W 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

黄嘌呤氧化酶 (XOD, EC 1.1.7.3.2) 属需氧脱氢酶类, 是活性氧主要来源之一, 也是核苷酸代谢的关键酶之一。XOD 主要分布于哺乳动物的肝脏等组织中, 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。

黄嘌呤氧化酶 (XOD) 催化黄嘌呤氧化生成尿酸和超氧阴离子自由基, 接着与显色剂反应生成有色物质, 通过检测有色物质的生成量多少即可计算得出 XOD 酶活性大小。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉体 1 支	4℃ 避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加 1.1mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 10mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	粉体 3 支	4℃ 保存	每支: 1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 0.1mL 试剂四振荡或超声溶解后, 再加 3.9mL 蒸馏水混匀使用 (务必加 0.1mL 试剂四溶解后再加水), 一周内用完。
试剂四	液体 0.7mL×1 支	4℃ 保存	

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取

① 组织样本:

取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 在 4℃ 或冰浴进行匀浆 (或使用各类常见匀浆器)。4℃×12000rpm 离心 10min, 取上清作为待测液。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取

② 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

③ 细菌/细胞样本: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 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 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、检测步骤

- ① 酶标仪预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 450nm。
- ② 测定前将试剂一、二和三 25℃水浴 5min 以上。
- ③ 用排枪操作，以减小各孔间因加入试剂时间先后导致的误差。
- ④ 试剂三每次加样前**务必**混匀，保证试剂的均一性。
- ⑤ 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	10
试剂二	90
试剂三	80
37℃避光孵育，立即于 450nm 读取吸光值 A1，30min 后读取 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】：若 ΔA 在零附近徘徊，可延长反应时间 T（如增至 60min）或加大样本量 V1（如增加至 40μL，则试剂二相应减少），则改变后的反应时间 T 和样本量 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1. 按样本鲜重计算：

酶活定义：37℃下每克组织样本每分钟催化产生 1nmol 有色物质为一个酶活单位（U）。

$$\text{XOD 活性(U/g 鲜重)} = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9) \div (W \times V1 \div V) \div T = 21.5 \times \Delta A \div W$$

2. 按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：37℃下每毫克蛋白样本每分钟催化产生 1nmol 有色物质为一个酶活单位（U）。

$$\text{XOD 活性(U/mg prot)} = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9) \div (V1 \times \text{Cpr}) = 21.5 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

3. 按液体体积计算：

酶活定义：37℃下每毫升样本每分钟催化产生 1nmol 有色物质为一个酶活单位（U）。

$$\text{XOD 活性(U/mL)} = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9) \div V1 \times D = 21.5 \times \Delta A$$

4. 按细菌或细胞数量计算：

酶活定义：37℃下每克组织样本每分钟催化产生 1nmol 有色物质为一个酶活单位（U）。

$$\text{XOD 活性(U/10}^4 \text{ cell)} = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9) \div (500 \times V1 \div V) \div T = 21.5 \times \Delta A \div 500$$

V---提取液体积，1 mL；

V1---加入反应体系中样本体积，0.02ml；

d---光径，0.5cm；

V2---反应体系总体积，200μL = 2×10⁻⁴L；

ε---甲臞物质的摩尔消光系数，3.1×10⁴ L /mol/cm；

T---反应时间，30min；

W---样本质量，g；

500---细菌或细胞总数，万；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。