

黄嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase, XOD) 试剂盒说明书

(货号: G0139W 微板法 96 样)

一、产品简介:

黄嘌呤氧化酶 (XOD, EC 1.17.3.2) 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:

试剂名称	规格	保存条件	备注
提取液	液体 120mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉体 mg×1 支	-20°C保存	使用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	液体 10mL×1 支	4°C保存	
试剂三	粉体 mg×3 支	4°C保存	临用前甩几下, 使粉剂落到底部, 每支加 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°C保存	

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、低温离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、黄嘌呤氧化酶 (XOD) 的测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备

① 组织样本:

取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 在 4°C 或冰浴进行匀浆(或使用各类常见匀浆器)。4°C×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 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°C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 (10⁴): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 450nm。

② 测定前将试剂一、二和三 25°C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:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	10
试剂二	90
试剂三	80
混匀, 立即于 450nm 读取吸光值 A1, 37°C 避光孵育 30min 后读取 A2, ΔA=A2-A1。	

五、结果计算:

1、按样本鲜重计算:

酶活定义: 37°C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°C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)。

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

3、按细胞数量计算:

酶活定义: 每 10⁶ 个细胞每分钟催化产生 1nmol 有色物质为一个酶活单位 (U)。

$$\text{XOD 活性(U/10}^6\text{cell)} = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9) \div (5 \times V1 \div V) = 21.5 \times \Delta A \div 5$$

4、按液体体积计算:

酶活定义: 37°C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)。

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

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;

T---反应时间, 30min;

ε---甲臞物质的摩尔消光系数, 3.1×10⁴ L/mol/cm;

W---样本质量, g;

5---细胞数量, 百万;

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。