

## 黄嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase, XOD) 活性试剂盒说明书

(货号: G0181F 分光法 48 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。

XOD 催化次黄嘌呤产生超氧阴离子, 超氧阴离子与盐酸羟胺反应生成  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  在对氨基苯磺酰胺和  $\alpha$ -萘胺的作用下, 生成紫红色的偶氮化合物, 在 540nm 有特征吸收峰, 根据其生成量可反映 XOD 活性的大小。

### 二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	液体 5mL×1 支	4°C 保存	
试剂三	液体 24mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂四	液体 25mL×1 瓶	4°C 保存	临用前, 可依据待检测样本数量, 把试剂四和试剂五等比例混合成无色的反应 mix (注意观察, 若变粉色, 则不能使用)。两天之内用完。
试剂五	液体 25mL×1 瓶	4°C 保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4°C 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

### 三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、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 ( $10^4$ ): 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 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 540nm, 蒸馏水调零。

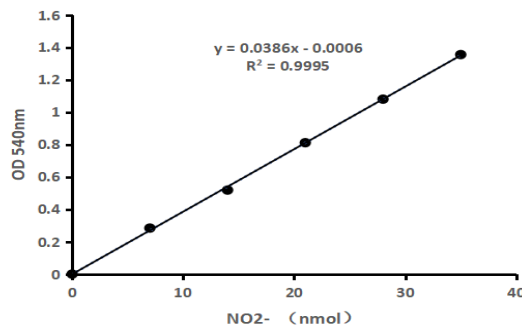
② 测定前将试剂一、二和三 25°C 水浴 5min 以上。

③ 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	70	70
试剂一	210	280
试剂二	70	
试剂三	175	175
混匀, 37°C (可用恒温培养箱) 反应 20min		
反应 mix	350	350
混匀, 37°C反应 10min (准确时间), 立即将全部液体转入比色皿 (光径 1cm)中 (若浑浊可于 8000rpm 室温下离心 5min 后转移), 于 540nm 处检测读取吸光度 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本需做一个自身对照)。		

## 五、结果计算:

1、标准曲线方程:  $y = 0.0386x - 0.0006$ , x 是  $\text{NO}_2^-$  的浓度 (nmol), y 是  $\Delta A$ 。



2、按照样本质量计算:

酶活定义: 37°C下每克组织样本每分钟催化产生 1nmol  $\text{NO}_2^-$  为一个酶活单位 (U)。

$$\begin{aligned} \text{XOD 活性(U/g 鲜重)} &= [(\Delta A + 0.0006) \div 0.0386] \div (V1 \div V \times W) \div T \times D \\ &= 18.5 \times (\Delta A + 0.0006) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按细菌/细胞计算:

酶活定义: 37°C下每克组织样本每分钟催化产生 1nmol  $\text{NO}_2^-$  为一个酶活单位 (U)。

$$\begin{aligned} \text{XOD 活性(U/10}^6 \text{ cell)} &= [(\Delta A + 0.0006) \div 0.0386] \div (V1 \div V \times 5) \div T \times D \\ &= 18.5 \times (\Delta A + 0.0006) \div 5 \times D \end{aligned}$$

4、按照液体体积计算:

酶活定义: 37°C下每克组织样本每分钟催化产生 1nmol  $\text{NO}_2^-$  为一个酶活单位 (U)。

$$\text{XOD 活性(U/mL)} = [(\Delta A + 0.0006) \div 0.0386] \div V1 \div T \times D = 18.5 \times (\Delta A + 0.0006) \times D$$

V---提取液的体积, 1mL;

V1---加入反应体系的样品量, 0.07mL;

W---样品鲜重, g;

5---细胞数量, 百万;

T---反应时间, 20min;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (100μmol/mL): 标准品用 1mL 的蒸馏水溶解。(母液需在两天内用且-20°C保存)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 μmol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样体系操作, 根据结果即可制作标准曲线。