

黄嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase, XOD) 试剂盒说明书

(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 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 |
| 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 40 μ L，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)。

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

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)。

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

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)。

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

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，200 μ L =2 $\times 10^{-4}$ L；

ε ---甲贲物质的摩尔消光系数，3.1 $\times 10^4$ L /mol/cm；

T---反应时间，30min；

W---样本质量，g；

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。