

黄嘌呤氧化酶（XOD）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

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。

货号：BC1090

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 75 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂二	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂三	液体 3.5mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂四	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂五	液体 25mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂六	液体 25 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
标准品	液体 1mL×1 支	2-8℃ 保存

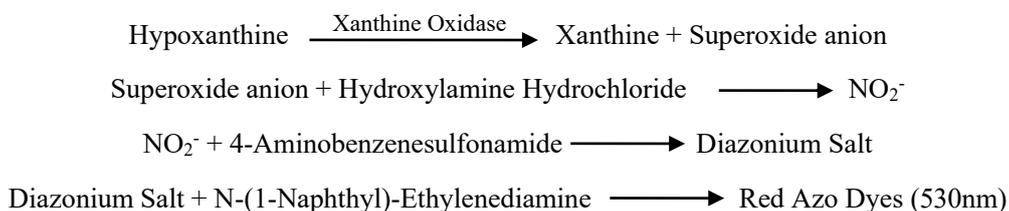
溶液的配制：

- 1、试剂三：临用前根据样本量用试剂二稀释 5 倍后备用。用不完的试剂 2-8℃ 可保存 1 周。
- 2、标准品：10μmol/mL 亚硝酸钠。

产品说明：

XOD（EC 1.17.3.2）催化黄嘌呤氧化生成尿酸和超氧阴离子，是活性氧主要来源之一；同时也是核苷酸代谢的关键酶之一。XOD 主要分布于哺乳动物的心、肺、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 催化次黄嘌呤产生黄嘌呤和超氧阴离子，超氧阴离子与盐酸羟胺反应生成 NO_2^- ， NO_2^- 在对氨基苯磺酰胺和萘乙二胺盐酸盐的作用下，生成紫红色的偶氮化合物，在 530nm 有特征吸收峰，根据其生成量可反映 XOD 活性的大小。



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、台式离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、匀浆器/研钵、细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

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）

1. 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（ 10^4 个）：试剂一体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一），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）；8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
2. 组织：按照组织质量（g）：试剂一体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一），进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
3. 血清（浆）样本等其他液体：直接检测。若有沉淀，离心后测定。

二、测定步骤

- 1、分光光度计预热30min以上，调节波长至530nm，蒸馏水调零。
- 2、标准液的稀释：将标准液用蒸馏水稀释至0.25 μ mol/mL（可以吸取25 μ L 10 μ mol/mL 亚硝酸钠和975 μ L蒸馏水混合）。实验中每个标准管需50 μ L标准溶液。
- 3、操作表

试剂名称（ μ L）	空白管	测定管	标准管
蒸馏水	50	-	-
上清液	-	50	-
标准液	-	-	50
试剂一	200	200	200
试剂三	200	200	200
试剂四	200	200	200
混匀，37℃水浴/恒温培养箱放置 20min			
试剂五	300	300	300
试剂六	300	300	300
混匀，37℃水浴/恒温培养箱放置 20min，于 1mL 玻璃比色皿中，测定 530nm 处吸光值，计算 ΔA 标准 = A 标准管 - A 空白管， ΔA 样本 = A 测定管 - A 空白管。空白管和标准曲线只需做 1-2 次。 注： ΔA 样本在 0.005-1 之间数值有效，数值过大或过小，可以稀释或者增加样本量。			

三、XOD 活性计算

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每mg组织蛋白每分钟催化产生1nmol NO₂⁻定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{XOD活性 (U/mg prot)} &= (\Delta A_{\text{样本}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times C_{\text{标}}) \times 10^3 \times V_{\text{样}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times F \\ &= 12.5 \times \Delta A_{\text{样本}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \times F \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算：

单位的定义：每g组织每分钟催化产生1nmol NO₂⁻定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{XOD活性 (U/g 质量)} &= (\Delta A_{\text{样本}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times C_{\text{标}}) \times V_{\text{提取}} \times 10^3 \div W \div T \times F \\ &= 12.5 \times \Delta A_{\text{样本}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F \end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞数量计算：

单位的定义：每万个细胞每分钟催化产生1nmol NO₂⁻定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{XOD活性 (U/10}^4\text{ cell)} &= (\Delta\text{A样本} \div \Delta\text{A标准} \times \text{C标}) \times \text{V提取} \times 10^3 \div 500 \div \text{T} \times \text{F} \\ &= 0.025 \times \Delta\text{A样本} \div \Delta\text{A标准} \times \text{F}\end{aligned}$$

(4) 按液体体积计算:

单位的定义: 每毫升液体每分钟催化产生1nmol NO₂定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{XOD活性 (U/mL)} &= (\Delta\text{A样本} \div \Delta\text{A标准} \times \text{C标}) \times 10^3 \div \text{T} \times \text{F} \\ &= 12.5 \times \Delta\text{A样本} \div \Delta\text{A标准} \times \text{F}\end{aligned}$$

C标: 标准溶液浓度: 0.25μmol/mL; 10³: 单位换算系数, 1μmol/mL=10³nmol/mL; T: 反应时间, 20min;

W: 样本质量, g; V提取: 试剂一体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; 500: 细胞或细菌总数, 500万;
F: 稀释倍数。

实验实例:

1、取 0.1011g 兔肾脏加入 1mL 试剂一进行冰浴匀浆, 8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上, 之后按照测定步骤操作, 用 1mL 比色皿测得计算ΔA 样本=A 测定管-A 空白管=0.177-0.002= 0.175, ΔA 标准=A 标准管-A 空白管=0.470-0.002=0.468, 按样本质量计算酶活得:

$$\text{XOD活性 (U/g 质量)} = 12.5 \times \Delta\text{A 样本} \div \Delta\text{A 标准} \div \text{W} \times \text{F} = 46.23 \text{ U/g 质量}。$$

2、取 0.01mL 牛奶, 加入 0.99mL 试剂一, 即稀释 100 倍后直接测定, 之后按照测定步骤操作, 用 1mL 比色皿测得计算ΔA 样本=A 测定管-A 空白管=0.013-0.002= 0.011, ΔA 标准=A 标准管 A 空白管=0.470-0.002=0.468, 按样本质量计算酶活得:

$$\text{XOD活性 (U/mL)} = 12.5 \times \Delta\text{A 样本} \div \Delta\text{A 标准} \times \text{F} = 29.38 \text{ U/mL}。$$

相关系列产品:

BC3590/BC3595 过氧化氢 (H₂O₂) 含量检测试剂盒

BC0690/BC0695 葡萄糖氧化酶 (GOD) 活性检测试剂盒

BC1270/BC1275 蛋白质羰基含量检测试剂盒

BC1280/BC1285 二胺氧化酶 (DAO) 活性检测试剂盒