

黄嘌呤氧化酶(XOD)活性检测试剂盒说明书

Xanthine Oxidase Assay Kit

紫外分光光度法

货号: AK306

规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES08	60mL×1 瓶	4℃保存;
AK306-A	60mL×1 瓶	4℃保存;
AK306-B	粉剂×4 瓶	4℃保存;
工作液的配制:	用前取 AK306-B 1 瓶加入 AK306-A 15ml 充分溶解混匀,待用;用不完的试剂 4℃可保存一周;	

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 黄嘌呤氧化酶 (Xanthine oxidase, XOD, EC 1.17.3.2) 是一种专一性不高,既能催化次黄嘌呤生成黄嘌呤,进而生成尿酸,又能直接催化黄嘌呤生成尿酸的酶,是一种含钼、非血红素铁、无机硫化物、FAD 的黄素酶,通常存在于哺乳动物的心,肺,肝脏等组织中。虽然血中 XO 活性通常很低,但肝损伤会导致 XO 释放到血液中。对肝损伤的诊断具有特异性的意义。

原理: XOD 催化黄嘌呤产生尿酸,尿酸在 290nm 下有特征吸收峰。

自备用品:

紫外分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1ml 石英比色皿、匀浆器/研钵、冰和蒸馏水。

粗酶液提取:

1. 细菌、细胞样品的制备:

细菌或培养细胞: 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): 提取液 ES08 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液 ES08), 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 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. 组织样品的制备:

组织: 按照组织质量 (g): 提取液 ES08 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液 ES08), 进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

3. 血清 (浆) 样品: 直接检测。

测定步骤

- 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 290nm, 蒸馏水调零。
- XOD 工作液现用现配, 配置方法见产品组成列表。
- 测定前将 XOD 工作液在 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 20min 以上。
- 在 1mL 石英比色皿中加入下列试剂

试剂名称	测定管 (μL)
工作液	1000
样本	35
立即混匀并计时, 记录 290nm 下初始吸光值 A1 和 1min 后的吸光值 A2, 计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。	

XOD 活性计算公式：

1. 血清（浆）XOD 计算：

单位的定义：每毫升血清（浆）每分钟催化产生 1nmol 尿酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{XOD (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 2424 \times \Delta A$$

2. 组织、细菌或细胞中XOD 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 尿酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{XOD (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 2424 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit (C05-02001)

（2）按样本鲜重计算：

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

$$\text{XOD (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2424 \times \Delta A \div W$$

（3）按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每一万个细菌或细胞每分钟催化产生1nmol 尿酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{XOD (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 4.848 \times \Delta A$$

注： V 反总：反应体系总体积，1.035×10⁻³ L； ε：尿酸摩尔消光系数，1.22×10⁴ L/mol/cm； d：比色皿光径，1cm； V 样：加入样本体积，0.035 mL； V 样总：加入提取液体积，1 mL； T：反应时间，1 min； W：样本质量，g； Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； 500：细胞或细菌总数，500 万； 10⁹：单位换算系数，1mol=10⁹μmol.