

## 黄嘌呤氧化酶（XOD）活性检测试剂盒说明书

微量法

**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：**D100170

**规格：**100T/96S

**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，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 120 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 10 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂三	液体 1mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂四	液体 5 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂五	液体 8 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂六	液体 8 mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8°C保存

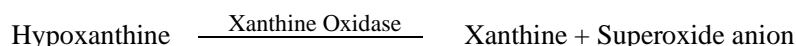
溶液的配制：

- 1、试剂三：根据样本量再用试剂二稀释 5 倍后备用。用不完的试剂 2-8°C 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) 催化次黄嘌呤氧化生成黄嘌呤和超氧阴离子，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/酶标仪、台式离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、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）样本等液体样本：直接检测。若有沉淀，离心后测定。

## 二、测定步骤

- 1、分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至530nm，分光光度计蒸馏水调零。
- 2、标准液的稀释：将标准液用蒸馏水稀释至0.25 $\mu$ mol/mL的标准液（可以吸取25 $\mu$ L 10 $\mu$ mol/mL 亚硝酸钠和975 $\mu$ L 蒸馏水混合）。
- 3、操作表

试剂名称（ $\mu$ L）	空白管	测定管	标准管
蒸馏水	10	-	-
上清液	-	10	-
标准液	-	-	10
试剂一	40	40	40
试剂三	40	40	40
试剂四	40	40	40
混匀，37℃水浴/恒温培养箱放置 20min			
试剂五	60	60	60
试剂六	60	60	60
混匀，37℃水浴/恒温培养箱放置 20min，于微量玻璃比色皿/96 孔板中，测定 530nm 处吸光值，计算 $\Delta A$ 标准=A 标准管-A 空白管， $\Delta A$ 样本=A 测定管-A 空白管。空白管和标准管只需做 1-2 次。 <b>注：</b> $\Delta A$ 样本在 0.005-1 之间数值有效，数值过小或过大，可以增加或者稀释样本量。			

## 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 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>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 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>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 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>定义为一个酶活力单位。

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

### (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 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>定义为一个酶活力单位。

XOD活性 (U/mL) = (ΔA样本 ÷ ΔA标准 × C标) × 10<sup>3</sup> ÷ T × F = 12.5 × ΔA样本 ÷ ΔA标准 × F

10<sup>3</sup>: 单位换算系数, 1μmol=10<sup>3</sup>nmol; C标: 标准溶液浓度, 0.25μmol/mL; T: 反应时间, 20min; W: 样本质量, g; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; V提取: 试剂一体积, 1mL; 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°C离心 10min, 取上清, 置冰上, 之后按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算ΔA 样本=A 测定管-A 空白管=0.155-0.052=0.103, ΔA 标准=A 标准管-A 空白管=0.450-0.052=0.398, 按样本质量计算酶活得:

XOD 活性 (U/g 质量) = 12.5 × ΔA 样本 ÷ ΔA 标准 ÷ W × F = 32.0U/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 96 孔板测得计算ΔA 样本=A 测定管-A 空白管=0.059-0.052= 0.007, ΔA 标准=A 标准管-A 空白管=0.450-0.052=0.398, 按样本质量计算酶活得:

XOD 活性 (U/mL) = 12.5 × ΔA 样本 ÷ ΔA 标准 × F = 22.0 U/mL。