Xanthine Oxidase (XOD) Activity Assay Kit

黄嘌呤氧化酶（XOD）试剂盒说明书

方法：微板法 | 规格：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℃保存	
试剂一	液体 1mL×1 支	4℃保存	
试剂二	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 10mL×1 瓶	4℃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 4ºC 或冰浴进行匀浆(或使用各类常见匀浆器)。4ºC×12000rpm 离心 10min，取上清作为待测液。

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℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

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 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℃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
混匀，立即于450nm读取吸光值A1，37℃避光孵育 30min 后读取 A2，ΔA=A2-A1。	

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）。

XOD 活性(U/g 鲜重)=(△A÷ε÷d×V2×10^9)÷(W×V1÷V)÷T=21.5×△A÷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）。

XOD 活性(U/mg prot)=(△A÷ε÷d×V2×10^9)÷(V1×Cpr)=21.5×△A÷Cpr

3、按细胞数量计算：

酶活定义：每 10^6 个细胞每分钟催化产生 1nmol 有色物质为一个酶活单位（U）。

XOD 活性(U/10^6cell)=(△A÷ε÷d×V2×10^9)÷(5×V1÷V)=21.5×△A÷5

4、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）。

XOD 活性(U/mL)=(△A÷ε÷d×V2×10^9)÷V1=21.5×△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，200μL =2×10^{-4}L；

T---反应时间，30min；　　ε---甲臜物质的摩尔消光系数，3.1×10^4 L /mol/cm；

W---样本质量，g；　　5---细胞数量，百万；

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。