

黄嘌呤氧化酶(XOD)活性检测试剂盒说明书

Xanthine Oxidase Assay Kit

微量法

货号: AK307

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES08	100mL×1 瓶	4℃保存;
AK307-A	30mL×1 瓶	4℃保存;
AK307-B	粉剂×2 瓶	4℃保存;
工作液的配制:	用前取 AK307-B1 瓶加入 AK307-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/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板)、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

- 分光光度计或酶标仪预热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 10min 以上。
- 在微量石英比色皿或96 孔板 (UV 板) 中加入下列试剂

试剂名称	测定管 (μL)
样本	10
工作液	250
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:

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下:

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。

$$\text{XOD (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 2131 \times \Delta A$$

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。

$$\text{XOD (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 2131 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

※ 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。

$$\text{XOD (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2131 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{XOD (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 4.26 \times \Delta A$$

注: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 2.6×10^{-4} L; ϵ : 尿酸摩尔消光系数, 1.22×10^4 L / mol / cm; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.01 mL; $V_{\text{样总}}$: 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。

b. 使用96孔板测定的计算公式如下:

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。

$$\text{XOD (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 4262 \times \Delta A$$

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。

$$\text{XOD (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 4262 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

※ 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。

$$\text{XOD (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 4262 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{XOD (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 8.52 \times \Delta A$$

注: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 2.6×10^{-4} L; ϵ : 尿酸摩尔消光系数, 1.22×10^4 L / mol / cm; d : 96 孔板光径, 0.5cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.01 mL; $V_{\text{样总}}$: 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。