黄嘌呤氧化酶（xanthione oxidase, XOD）试剂盒说明书

一、指标介绍：

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 1 支	4℃避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加 1.1mL 蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉体 3 支	4℃保存	每支： 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 0.1mL 试剂四振荡或超声溶解后，再加 3.9mL 蒸馏水混匀使用（务必加 0.1mL 试剂四溶解后再加水），一周内用完。
试剂四	液体 0.7mL×1 支	4℃保存	

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取

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。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取

② 液体样本：直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。

③ 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。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10^4）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

本实验亦可用裂解液裂解细胞样本进行后续实验检测，裂解方式以裂解液操作说明为准。

2、检测步骤

① 酶标仪预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），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：

试剂组分（μL）	测定管
样本	20
试剂一	10
试剂二	90
试剂三	80
37℃避光孵育，立即于 450nm 读取吸光值 A1，30min 后读取 A2，ΔA=A2-A1。	

【注】：若ΔA 在零附近徘徊，可延长反应时间 T（如增至 60min）或加大样本量 V1（如增加至 40μL，则试剂二相应减少），则改变后的反应时间 T 和样本量 V1 需代入计算公式重新计算。

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)=$(\triangle A\div\varepsilon\div d\times V2\times10^9)\div(W\times V1\div V)\div T=21.5\times\triangle A\div W$

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)=$(\triangle A\div\varepsilon\div d\times V2\times10^9)\div(V1\times Cpr)=21.5\times\triangle A\div Cpr$

3. 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)=$(\triangle A\div\varepsilon\div d\times V2\times10^9)\div V1\times D=21.5\times\triangle A$

4、按细菌或细胞数量计算：

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/10^4 cell)=$(\triangle A\div\varepsilon\div d\times V2\times10^9)\div(500\times V1\div V)\div T=21.5\times\triangle A\div500$

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；
ε---甲臜物质的摩尔消光系数，3.1×10^4 L /mol/cm；
T---反应时间，30min；　　W---样本质量，g；
500---细菌或细胞总数，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。