

# 黄嘌呤氧化酶 (XOD) 测定试剂盒说明书

(货号:A002-1-1 比色法 50 管/48 样)

**免责声明:** 测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

## 一、测定意义:

黄嘌呤氧化酶(Xanthine Oxidase XOD)主要存在于哺乳动物的乳汁及肝脾中,属需氧脱氢酶类,是体内核酸代谢中的重要酶,在肝细胞损伤时,此酶早于 SGPT 释放于血清中,并且升高明显,其对鉴别肝细胞性黄疸及阻塞性黄疸有明显的测定意义,并且在缺氧过程中黄嘌呤脱氢酶很快形成黄嘌呤氧化酶,其对自由基的产生起了重要作用。

## 二、测试原理:

XOD 可催化次黄嘌呤生成黄嘌呤,与此同时产生超氧阴离子自由基,当有电子受体及显色剂存在的情况下,生成紫红色结合物,根据后者生成量的多少可以推算出 XOD 的活力。

## 三、试剂组成与配制:(试剂盒有效期 6 个月)

**试剂一:** 液体 20mL×3 瓶, -20℃ 以下冷冻保存,用时根据需要量取出室温或 37℃ 水浴融化后用。

**试剂二:** 液体 5mL×1 瓶, 4℃ 保存。

**试剂三:** 黄色液体 6mL×2 瓶, 4℃ 避光保存。

**试剂四:** 粉剂×2 支, 稀释液 0.6mL×2 支, -20℃ 以下冷冻保存;临用前取稀释液一支加到一支粉剂中溶解,配好的试剂-20℃ 以下冰箱或冰室保存。尽量避免反复冻溶。(注:试剂四粉剂本身量较少,可能会附着于管壁或盖子内(并非空管),可 4000 转/分钟离心 2 分钟后再用稀释液溶解)

**试剂五:** 终止液 60mL×1 瓶, 4℃ 冰箱保存。

## 四、所需仪器及试剂:

可见光分光光度计及 1cm 光径比色皿, 涡旋混匀器, 37℃ 水浴锅或恒温箱, 试管或离心管, 蒸馏水, 生理盐水, 组织蛋白测定试剂(本公司有售)。

## 五、操作步骤:

### 1、样本前处理:

(1)、**血清(浆):** 血清可直接取样进行检测;血浆需以 3000~3500 转/分, 离心 10 分钟, 小心吸取澄清的上清进行检测。若仍有混浊可反复离心;

(2)、**红细胞:** 抗凝全血以 1000 转/分, 离心 10 分钟, 弃上层血清, 取下层红细胞按 1:49 的比例加蒸馏水制成溶血液待测(溶血液需要测定其血红蛋白浓度, 血红蛋白测定试剂本公司有售)。配好的溶血液最好当天做检测, 4℃ 存放时间不超过 8 小时;

(3)、**组织:** 准确称取组织重量, 按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例加入 9 倍体积的匀浆介质(推荐 0.9% 的生理盐水),冰水浴条件下,机械匀浆,制备成 10% 的匀浆液,2500~4000 转/分钟,离心 10 分钟,取上清液进行测定。

### (4)、培养细胞:

①、**收集细胞:** 如果是悬浮培养的细胞,可直接通过离心收集沉淀细胞(1000 转/分, 离心 10 分钟, 弃上清留沉淀细胞);如果是贴壁培养的细胞,可通过细胞刮直接将细胞刮下;或者吸去上清,用 0.25% 的胰酶室温消化 2~3 分钟,加培养液终止消化,用微量移液器轻轻吹打,将所有液体吸出转入 EP 管,然后 1000 转/分,离心 10 分钟弃上清,留沉淀细胞,再加入 1mL PBS 轻轻吹打,再次 1000 转/分,离心 10 分钟弃上清,留沉淀细胞待用。如暂时不做,则可以将细胞低温冻存,温度越低越好。

②、**细胞破碎:** 第一种方法是研磨破碎(在细胞沉淀中加入一定量(10<sup>6</sup> 数量级的细胞一般加 0.3~

0.5mL)的缓冲液(缓冲液可以用 0.01mol/L 的 PBS 或者是生理盐水),用手动玻璃匀浆器冰水浴研磨 3~5 分钟,或者是用卡富隆电动研磨器冰水浴研磨 3 分钟);第二种方法是超声破碎(在细胞沉淀中加入一定量(10<sup>6</sup> 数量级的细胞一般加 0.3~0.5mL)的缓冲液(缓冲液可以用 PBS 或者是生理盐水),需保证超声探头在液面以下。功率 300W,冰水浴,每次超声 3~5 秒,间隔 4 次(每次间隔时间为 30 秒左右))(推荐此法);第三种方法反复冻融(可以用液氮进行反复冻融,让细胞在 EP 管或者是冻存管中加入一定量的低渗液或者蒸馏水,直接放入液氮中 3~5 秒,立即提出转入-20℃ 冰箱(20~30 秒),再取出室温解冻,解冻后再按前面重复 3 次。(注意从液氮中取出不可直接置于室温解冻,这样 EP 管等容易炸裂导致样本损失,所以一定要用冷冻进行梯度解冻))(此方法不推荐,因温度高低反复时会影响酶活性);第四种方法是化学裂解(贴壁培养的细胞,可直接将上清吸去后,直接在孔板或是瓶中加入一定量的裂解液(推荐用 1%-2% 的 Triton X-100,覆盖满细胞),置冰上裂解 30~40 分钟(可用显微镜观察细胞破碎情况,如效果不好可延长时间),再用微量移液器吸出待测)。

注:细胞破碎后如溶液均匀无杂质,可直接使用,无须离心;另外破碎后的匀浆液也需要进行预试且测定其蛋白浓度(蛋白浓度可用本公司的 BCA 或考马斯亮蓝试剂盒测定),用于计算。

### 2、操作表:

	空白管	测定管
蒸馏水 (mL)	a*	
样品 (mL)		a*
试剂一 (mL)	1	1
试剂二 (mL)	0.05	0.05
试剂三 (mL)	0.2	0.2
试剂四 (mL)	0.02	0.02
混匀, 37℃ 水浴 20 分钟		
试剂五 (mL)	1.0	1.0
混匀, 530nm, 1cm 光径, 蒸馏水调零, 测各管吸光度值		

注: a\*为取样量(如血清为 0.05~0.1mL; 1:49 溶血液为 0.05mL; 10% 肝组织匀浆为 0.02~0.1mL。)

## 六、计算:

### 1、血清 XOD 活力计算:

定义: 每升血清(浆)在 37℃ 每分钟转化 1μmol 的底物所需的酶量为一个酶活力单位 U。

计算公式:

$$\text{血清XOD活力 (U/L)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{\epsilon} \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \times \frac{1}{T \times d}$$

### 2、溶血液 XOD 活力计算:

定义: 每克血红蛋白在 37℃ 每分钟转化 1μmol 的底物所需的酶量为一个酶活力单位 U。

计算公式:

$$\text{溶血液XOD活力 (U/gHb)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{\epsilon} \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \times \frac{1}{T \times d} \div C_{\text{Hb}}$$

### 3、组织及培养细胞 XOD 活力计算:

定义: 每克蛋白对应的样本在 37℃ 每分钟转化 1μmol 的底物所需的酶量为一个酶活力单位 U。

计算公式:

$$\text{组织中XOD活力 (U/g 蛋白)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{\epsilon} \times \frac{V_{\text{反总}}}{V_{\text{样}}} \times \frac{1}{T \times d} \div \text{Cpr}$$

以上公式中，  
 ε 为呈色物消光摩尔系数，12.6×10<sup>-3</sup>；  
 V<sub>反总</sub> 为反应液总体积，(2.27+a) mL；  
 V<sub>样</sub> 为取样量，mL；  
 T 为反应时间，20 分钟；  
 d 为比色光径，1cm 。  
 C<sub>Hb</sub> 为血红蛋白含量，gHb/L。  
 C<sub>pr</sub> 为匀浆蛋白含量，g/L。

**七、注意点：**

- 1、试剂一、试剂四放-20℃保存，尽量避免反复冻溶，如要多次使用，请在第一次解冻（或试剂四配好）后分装好再保存。
- 2、组织块要用生理盐水漂洗后，滤纸吸干，-20℃以下可保存3个月。
- 3、血浆在检测过程中易引起混浊，需在测试前以3000~3500转/分，离心10分钟，小心吸取澄清的上清，弃去上层脂肪与下层沉淀，若仍有混浊可反复离心。
- 4、溶血液测定时，空白管中的蒸馏水应换成溶血液且在试剂五加完后加。