

黄嘌呤氧化酶 (XOD) 测定试剂盒说明书(精简版)

(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、所需仪器、试剂及耗材:

含 530nm 波长的分光光度计及 1cm 光径比色皿、37℃ 恒温水浴或气浴箱、台式低速离心机、各种规格移液器、双蒸水、生理压水 (0.9%) 或 PBS (0.1M)、涡旋混匀器、一次性塑料试管 (或离心管)、蛋白测定试剂 (组织或细胞样本用, 本公司有售)。

四、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 3 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融化或 37℃ 水浴融化。

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 4 号稀释液 0.6mL 稀释 4 号粉剂一支, 稀释好的 4 号试剂-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。

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 的比例加双蒸水制成溶血液待测。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 0.86% 或 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, 2500~3000 转/分钟, 离心 10 分钟, 取上清液进行测定。

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, 双蒸水调零, 测各管吸光度值		

六、参考取样量 (a*):

血清 50~100μL; 1:49 溶血液 50μL; 10% 肝组织匀浆 20μL~100μL。

七、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。

计算公式:

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

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。

计算公式:

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

3、组织 XOD 活力计算:

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

计算公式:

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

注: ϵ 为呈色物消光摩尔系数, 12.6×10^{-3} ;

$V_{\text{反总}}$ 为反应液总体积, (2.27+a) mL;

$V_{\text{样}}$ 为取样量, mL;

T 为反应时间, 20 分钟;

d 为比色光径, 1cm。

C_{Hb} 为血红蛋白含量, gHb/L。

C_{pr} 为匀浆蛋白含量, gprot/L。

八、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 个月以上。
- 3、血浆中 XOD 的检测: 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。