黄嘌呤氧化酶（xanthione oxidase, XOD）试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

XOD（EC 1.17.3.2）催化黄嘌呤氧化生成尿酸和超氧阴离子，是活性氧主要来源之一；同时也是核苷酸代谢的关键酶之一。XOD 主要分布于哺乳动物的心，肺，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。

测定原理：

XOD 催化黄嘌呤产生尿酸，尿酸在 290nm 下有特征吸收峰。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：60mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：60mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×4 瓶，4℃保存。

粗酶液提取：

1、细菌、细胞或组织样品的制备：

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），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。

组织：按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、血清（浆）样品：直接检测。

操作步骤：

1、 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 290nm，蒸馏水调零。

2、 XOD 检测工作液的配制：用时在每瓶试剂二中加入 15mL 试剂一，充分混匀，现配现用；

3、测定前将 XOD 检测工作液 37℃(哺乳动物)或 25℃（其它物种）水浴 10min。

4、取 1mLXOD 检测工作液于 1mL 石英比色皿中，再加入 35μL 样本，混匀，室温下立即测定 290nm 下的初始吸光值 A1 和 1min 后的吸光值 A2，计算 ΔA＝A2-A1。

XOD 活性计算：

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。

XOD（nmol/min/mL）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷V 样÷T=2424×ΔA

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。

XOD（nmol/min/mg prot）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(V 样×Cpr)÷T =2424×ΔA÷Cpr

（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。

XOD（nmol/min/g 鲜重）＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷（W ×V 样÷V 样总）÷T=2424×ΔA÷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。

XOD（nmol/min/10^4 cell）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷（500×V 样÷V 样总）÷T=4.848×ΔA

V 反总：反应体系总体积，1.035×10^{-3} 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 样：加入样本体积，0.05 mL；V 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。