（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K805-M

产品规格：48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器：酶标仪(540-560 nm)

Elabscience®黄嘌呤氧化酶（XOD）比色法测试盒

Xanthine Oxidase (XOD) Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清、血浆及动物组织样本中的黄嘌呤氧化酶的活力。

检测原理

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，在缺氧过程中黄嘌呤脱氢酶很快形成黄嘌呤氧化酶，黄嘌呤氧化酶对自由基的产生起了重要作用。

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。

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法。(货号：E-BC-K318-M)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	10 mL×1 瓶	20 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物溶液 (Substrate Solution)	0.5 mL×1 支	1 mL×1 支	-20°C 避光保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	酶试剂 (Enzymatic Reagent)	0.5 mL×1 支	1 mL×1 支	-20°C 避光保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 1 (Chromogenic Agent 1)	0.8 mL×1 支	1.6 mL×1 支	-20°C 避光保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	显色剂 2 (Chromogenic Agent 2)	0.8 mL×1 支	1.6 mL×1 支	-20°C 避光保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	1 mmol/L 标准品溶液 (1 mmol/L Standard Solution)	1.6 mL×1 支	3.2 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月

	96 孔酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(540-560 nm，最佳检测波长 550 nm)、37ºC 恒温箱

试剂：双蒸水，生理盐水(0.9 %NaCl)

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 显色剂工作液的配制：

将试剂四:试剂五按体积比 ＝1: 1配制，现配现用，按需配制，避光待用，配好的显色剂显色剂工作液1 h用完。

③ 工作液的配制：

将试剂一:试剂二:试剂三:显色剂工作液按体积比=147 : 6.5 : 6.5 : 20配制，避光待用，现配现用。

④ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mmol/L)	**0**	**0.2**	**0.3**	**0.4**	**0.6**	**0.7**	**0.8**	**1**
1 mmol/L 标准品(μL)	0	40	60	80	120	140	160	200
双蒸水(μL)	200	160	140	120	80	60	40	0

样本准备

① 样本处理

组织样本匀浆：组织样本使用生理盐水（0.9% NaCl）匀浆处理，离心后，取上清待测。留取部分上清进行蛋白浓度测定。

血清（浆）样本：直接检测。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.067-39.30 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
大鼠血浆	不稀释	10 %大鼠肝组织	不稀释
大鼠血清	不稀释	10 %大鼠肾组织	不稀释
10 %小鼠肾组织	不稀释	10 %小鼠肝组织	不稀释

注：稀释液为生理盐水(0.9 %NaCl)。

操作步骤

① 标准孔：取 20 μL 不同浓度的标准品溶液，分别加入相应的酶标孔中。测定孔：取 20 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。

② 向①中加入 180 μL 工作液。

③ 振板 5 s，酶标仪 550 nm 波长下检测测定待测孔 OD 值 A_1。

④ 37°C 孵育 25 min 后检测测定孔 OD 值 A_2 和标准孔的 OD 值。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度的标准品溶液(μL)	20	--
待测样本(μL)	--	20
工作液(μL)	180	180
振板 5 s，酶标仪 550 nm 波长下检测测定待测孔 OD 值 A_1。37°C 孵育 25 min 后检测测定孔 OD 值 A_2 和标准孔的 OD 值。		

结果计算

标准品拟合曲线：$y = ax + b$

① 血清（浆）中黄嘌呤氧化酶（XOD）活力计算公式：

定义：37°C 条件下，每升血清或血浆每分钟催化底物产生 1 μmol 的 H_2O_2 所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{XOD 活力 (U/L)} = (\Delta A_{550} - b) \div a \div T \times f \times 1000$$

② 组织样本中黄嘌呤氧化酶（XOD）活力计算公式：

定义：37°C 条件下，每克组织蛋白每分钟催化底物产生 1 μmol 的 H_2O_2 所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{XOD 活力 (U/gprot)} = (\Delta A_{550} - b) \div a \div T \times f \div C_{pr} \times 1000$$

注解:

y：标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x：标准品的浓度

a：标曲的斜率

b：标曲的截距

ΔA_{550}：样本的变化 OD 值（$\Delta A_{550} = A_2 - A_1$）

T：反应时间，25 min

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

C_{pr}：待测样本的蛋白浓度(gprot/L)

1000：单位换算，1 mmol/L=1000 μmol/L

附录1 关键数据

1.技术参数

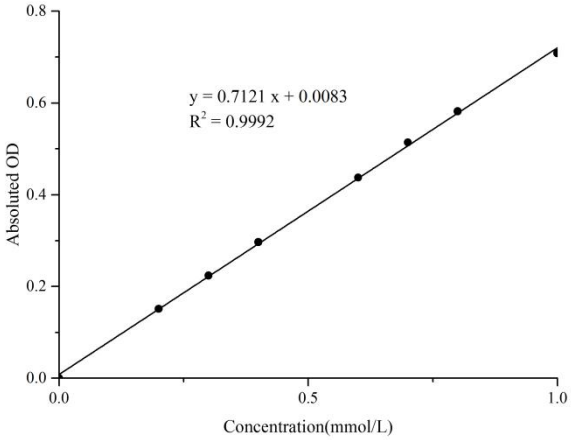
检测范围	0.067-39.30 U/L	**平均批间差**	9.9 %
灵敏度	0.067 U/L	**平均批内差**	3 %
平均回收率	99 %		

2.标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量20 μL，按照操作步骤进行实验，OD值如下表所示：

标准品浓度 (mmol/L)	**0**	**0.2**	**0.3**	**0.4**	**0.6**	**0.7**	**0.8**	**1.0**
OD 值	0.042	0.194	0.268	0.327	0.484	0.561	0.631	0.757
	0.041	0.192	0.263	0.350	0.474	0.550	0.616	0.743
平均 OD 值	0.042	0.193	0.266	0.339	0.479	0.556	0.624	0.750
绝对 OD 值	0	0.152	0.224	0.297	0.438	0.514	0.582	0.709

② 绘制标曲(如下图)：



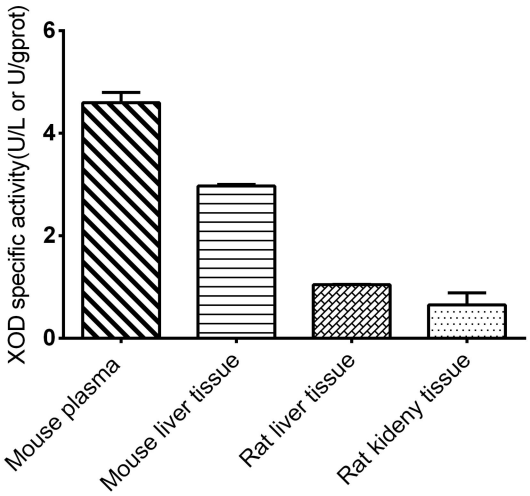
附录2 实例分析

例如小鼠肝组织(数据仅供参考)：

取10 %小鼠肝组织匀浆20 μL加入到酶标板孔中，按操作表操作，结果如下：标准曲线：$y = 0.7121\ x + 0.0083$，样本A_1值为0.144，25 min时样本A_2值为0.453，$\Delta A_{550} = A_2 - A_1 = 0.453 - 0.144 = 0.309$，测定出小鼠肝组织匀浆的蛋白含量为5.68 gprot/L，计算结果为：

$$\text{XOD活力(U/gprot)} = (0.309 - 0.0083) \div 0.7121 \div 25 \div 5.68 \times 1000 = 2.97\ \text{U/gprot}$$

按说明书操作，测定小鼠血浆(加样量20 μL)、小鼠肝组织(10 %组织匀浆蛋白含量5.68 gprot/L，加样量20 μL)、大鼠肝组织(10 %组织匀浆蛋白含量5.01 gprot/L，加样量20 μL)、大鼠肾组织(10 %组织匀浆蛋白含量4.19 gprot/L，加样量20 μL)中的XOD活力(如下图)：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
标准品不成线性	标准品浓度稀释错误	按照标准品稀释表重新标准品
	计算错误	按照计算公式进行计算
	使用过期的试剂	选择在保质期内的试剂
样本测不出值	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本，重新检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。