

CheKine™ 黄嘌呤氧化酶 (XO) 活性分析试剂盒 (微量法)

货号: KTB1070

规格: 48 T/48 S

96 T/96 S

批号: 见产品标签

	检测范围: 15.6-500 mU/mL		灵敏度: 15.6 mU/mL
	适用样本: 动植物组织、细胞、细菌、血清或血浆		
	保质期: -20℃, 避光保存 6 个月		

01 背景与原理

黄嘌呤氧化酶 (EC 1.17.3.2) 或黄嘌呤氧化还原酶是人体中嘌呤分解代谢的末端酶, 催化次黄嘌呤羟基化为黄嘌呤, 然后催化生成尿酸。当作为 NADH 氧化酶时, XO 是超氧化物 ($O_2^{\cdot-}$) 的生成物, 超氧化物 ($O_2^{\cdot-}$) 是一种强大的活性氧 (ROS)。XO 在缺血-再灌注损伤期间会产生过氧化氢 (H_2O_2) 和超氧化物 ($O_2^{\cdot-}$)。由于它们的高反应性, 这些 ROS 会影响细胞的各种分子组分, 过量导致细胞变性和死亡。XO 在健康个体的肝脏和空肠中以可观量存在。在各种肝脏疾病中, 已经发现循环 XO 的水平会显著增加。因此, 血清 XO 水平的测定可作为判断黄疸等急性肝损伤疾病的敏感指标。

本试剂盒检测原理是 XO 将黄嘌呤氧化成超氧化物 ($O_2^{\cdot-}$)。超氧化物 ($O_2^{\cdot-}$) 与四唑盐 WST-8 染料反应形成水溶性有色甲瓞产物, 可在 450 nm 下进行定量。样品中存在的黄嘌呤氧化酶与获得的信号成正比。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存条件
	48 T	96 T	
Extraction Buffer	70 mL	70 mL×2	4℃
Assay Buffer	10 mL	20 mL	4℃
Sample Diluent	5 mL	10 mL	4℃
WST-8	300 μL	600 μL	-20℃, 避光保存
Enhancer	60 μL	120 μL	-20℃, 避光保存
Xanthine	300 μL	600 μL	-20℃

*请在实验前检查各组分的量。

*各组分在规格基础上额外提供 10% 的量用于进行标准曲线制作或预实验。

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 450 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	PBS	清洗样本用
其他	匀浆器（组织样本）、超声破碎仪、冰盒、低温离心机、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- 正式检测前，建议选择 **2-3** 个预期差异较大的样本进行预实验。
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 各小瓶组分开盖前，请先低速离心。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，请在实验全程做好生物安全防护，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Extraction Buffer	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Assay Buffer	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Sample Diluent	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
WST-8	即用型；	使用前，冰上避光放置；分装避光保存于-20℃
Enhancer	即用型；	使用前，冰上避光放置；分装保存于-20℃避光保存。
Xanthine	即用型；	可能看起来混浊，在移液前短暂涡旋。使用前，冰上放置；分装保存于-20℃保存。

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。裂解后的样品可以用 **Extraction Buffer** 稀释。

- **动物组织：**称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL Extraction Buffer，冰浴匀浆，12000 g，4℃离心 5 min，取上清液，置冰上待测。
- **植物组织：**称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL Extraction Buffer 捣碎，冰浴超声破碎 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），然后 12000 g，4℃离心 5 min，取上清液，置冰上待测。
- **细胞或细菌样本：**收集 5×10^6 个细胞或细菌，用冷的 PBS 清洗细胞或细菌，800 g 离心 2 min 后弃上清，加入 1 mL Extraction Buffer，然后 12000 g，4℃离心 5 min，取上清液，置冰上待测。
- **血清或血浆：**直接检测。

05-3 实验步骤

1. **酶标仪准备：**预热 30 min 以上，调节波长到 450 nm。
2. **Working Reagent 的配制：**每孔准备 85 μ L Working Reagent，现配现用。Working Reagent 配比：74 μ L Assay Buffer，5 μ L Xanthine，5 μ L WST-8，1 μ L Enhancer。
3. **检测体系配制：**按如下体系在 96 孔板中进行检测体系配制。空白孔只需测定 1 次。

试剂	空白孔 (μ L)	测定孔 (μ L)
样本	0	20
Sample Diluent	20	0
Working Reagent	80	80

4. 混匀，室温（25℃）孵育 30 min。
5. 吸光度检测：测定 450 nm 处吸光值 A，分别记为 $A_{\text{空白}}$ 和 $A_{\text{测定}}$ 。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn)>进入“技术中心”>查找“在线计算器”工具。



06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。

2. 标准曲线

标准曲线公式： $y = 574.46x + 8.2497$ ， $R^2 = 0.9995$ ，其中，x 代表 $\Delta A_{\text{标准}}$ ，y 代表黄嘌呤氧化酶标准品浓度 (mU/mL)，将 $\Delta A_{\text{测定}}$ 代入方程得到 y 值。

3. 样本 XO 浓度计算

- 按样本质量计算

XO 活性 (mU/g) = $y \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = y \div W$

- 按血清和血浆体积计算

XO 活性 (mU/mL) = $y \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} = y$

- 按细胞或细菌密度计算

$$\text{XO 活性 (mU/10}^4\text{)} = y \times V_{\text{样}} \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = y \div N$$

- 按蛋白浓度数量计算

$$\text{XO 活性 (mU/mg)} = y \times V_{\text{样}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) = y \div \text{Cpr}$$

$V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.02 mL; W : 样本质量, g; $V_{\text{样总}}$: 加入 Extraction Buffer 体积, 1 mL; N : 细胞或细菌数量, 以 10^4 为单位 (例如细胞数量为 5×10^6 , $N=500$); Cpr : 样本蛋白质浓度, mg/mL。

07 结果展示

示例-1: 取小鼠血清, 按照测定步骤操作, 用 96 孔板进行检测。测得 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.204 - 0.055 = 0.149$, 代入标准曲线公式, 计算 $y = 93.8$ 。按血清和血浆体积计算得: XO 活性 (mU/mL) = $y \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} = y = 93.8$ mU/mL。

08 FAQ

- 检测得到的样本 $A_{\text{测定}}$ 过高或者过低怎么办?

如果样本 $A_{\text{测定}} > 1.0$, 需用 Extraction Buffer 适当稀释, 再重新测定。如果样本的 $\Delta A_{\text{测定}} < 0.005$, 可适当提高样本量。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1140	CheKine™ 多酚氧化酶 (PPO) 活性检测试剂盒 (微量法)
KTB1050	CheKine™ 脂质过氧化 (丙二醛) 含量检测试剂盒 (微量法)
KTB1040	CheKine™ 过氧化氢酶 (CAT) 活性分析试剂盒 (微量法)
KTB1041	CheKine™ 过氧化氢 (H ₂ O ₂) 含量检测试剂盒 (微量法)

CheKine™ 黄嘌呤氧化酶 (XO) 活性分析流程示意图

(Abbkin 货号：KTB1070)

