

黄嘌呤氧化酶抑制筛选检测试剂盒说明书

规格：微量法 96样

检测波长：450nm

编号：JLC_K14812

线性范围：10%-80%

检测原理：WST-8显色法

注意

正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定。

测定意义

黄嘌呤氧化酶(Xanthine oxidase, XOD)是一种催化次黄嘌呤羟基化为黄嘌呤及黄嘌呤羟基化为尿酸的酶,由肾脏排泄,尿酸产生过多或排泄不足会导致高尿酸血症。因此开发 XOD 抑制剂可以用于治疗高尿酸和通风类疾病的研究。

测定原理

黄嘌呤氧化酶 (XOD)催化黄嘌呤氧化生成尿酸和超氧阴离子自由基,接着与显色剂反应生成有色物质,在加入抑制剂后,450nm显色的产生会被抑制,根据抑制的程度来确定抑制剂的作用效果。

需自备的仪器和用品

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制

试剂名称	规格	数目	贮藏	备注
试剂一	液体120mL	x1	4°C	可用于提取稀释样品
试剂二	粉剂	x2	4°C,避光	加9mL试剂一超声溶解,现配现用
试剂三	液体	x2	-20°C,避光	避免反复冻融
试剂四	液体3mL	x1	-20°C,避光	避免反复冻融
试剂五	非布索坦	x1	-20°C,避光	5 mmol/L非布索坦,测定抑制率可作为参考, IC50约为3μmol/L

样品处理

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(104个):试剂一体积(mL)为500~1000:1的比例(建议500万细菌或细胞加入1mL试剂一

), 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°C离心10min, 取上清, 置冰上待测。

组织: 按照组织质量(g): 试剂一体积(mL)为1: 5~10的比例(建议称取约0.1g组织, 加入1mL试剂一), 进行冰浴匀浆。8000g 4°C离心10min, 取上清, 置冰上待测。

2、液体样品: 直接检测。

操作步骤

1. 酶标仪预热30min以上, 调节波长至450nm

2. 各试剂准备过程注意避光, 试剂三置于冰盒上待用。阳性对照孔测定的为XOD特异性抑制剂的抑制率, 仅可作为参考, 实际测定过程中可选做孔, 在本试剂盒中的IC50约在3 μ mol/L, 实测数据会有差异。

3. 在96孔板中依次加入:

试剂 (μ L)	空白孔	总酶活孔	阳性对照孔	测定孔
样本	-	-	-	15
试剂一	25	15	-	-
试剂二	150	150	150	150
试剂三	-	10	10	10
样本	25	25	25	25
试剂四	-	-	15	-

37°C避光孵育, 立即于450nm读取吸光值A1, 6min后读取A2, $\Delta A = A2 - A1$

XOD活性抑制率计算

1. 抑制率计算公式:

抑制率(%) = $(\Delta A_{\text{总}} - \Delta A_{\text{测}}) \div (\Delta A_{\text{总}} - \Delta A_{\text{空}}) \times 100\%$

$\Delta A_{\text{总}}$: 总酶活孔 OD 值;

$\Delta A_{\text{测}}$: 测定孔 OD 值;

$\Delta A_{\text{空}}$: 空白孔 OD 值

备注: 抑制率在 10%-80%区间内呈线性, 超过 80%, 抑制率曲线会渐趋平缓, 如果需要在线性范围内测定抑制率, 需要提前做预实验, 选取合适的稀释倍数或样本量

2. IC50 计算:

IC50, 即抑制剂半抑制浓度。对于确定对黄嘌呤氧化酶有抑制作用的样本, 可配制成适当的浓度梯度, 分别以样本浓度为横坐标, 以抑制率为纵坐标做标准曲线, 以此计算得到抑制率为 50%时的样本浓度, 即 IC50。

预实验的意义

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测, 以免造成试剂盒和样本的浪费(比如低表达处理的样本);
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程, 尤其是初次使用生化试剂盒测定;
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适;
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题, 以便于及时作出调整;
- 5、通过3 - 5组预实验, 判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围, 指导实验样本稀释比例。