



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：TW55474

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痛风类疾病的研究。

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℃,避光	避免反复冻融
试剂四	液体 3mL	x1	-20℃,避光	避免反复冻融
试剂五	非布索坦	x1	-20℃,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℃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℃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 μmol/L，实测数据会有差异。
3. 在 96 孔板中依次加入：

试剂 (μL)	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。