

(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-F019

产品规格：96T(40 samples)

检测仪器：荧光酶标仪(激发波长 535 nm, 发射波长 587 nm)

## Elabscience<sup>®</sup>黃嘌呤氧化酶(XOD)荧光法测试盒

Xanthine Oxidase (XOD) Activity

Fluorometric 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](mailto:biochemical@elabscience.cn)

网址：[www.elabscience.cn](http://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黄嘌呤氧化酶的活力。

## 检测原理

次黄嘌呤可被黄嘌呤氧化酶(XOD)氧化产生黄嘌呤和超氧阴离子，超氧阴离子在体系内很快转换为过氧化氢，在过氧化物酶作用下，过氧化氢将无荧光探针氧化为有荧光的物质，通过测定体系的荧光值，即可计算出相应黄嘌呤氧化酶的活性。

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 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	60 mL×1 瓶	-20 ℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	探针 (Probe Solution)	0.3 mL×1 支	-20 ℃避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	粉剂×1 支	-20 ℃ 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	底物 (Substrate)	4 mL×1 瓶	-20 ℃避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	2 mmol/L 过氧化氢标准品 (2 mmol/L H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Standard Solution)	1.5 mL×1 支	-20 ℃ 保存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	1 板	
	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明：试剂严格按照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：荧光酶标仪(激发波长 535 nm, 发射波长 587 nm)

## 试剂准备

① 检测前，所有试剂平衡至室温。

② 试剂三应用液的配制：

向试剂三中加入0.3 mL试剂一，混匀溶解即可，现用现配，于-20°C可保存30天。

③ 测定工作液的配制：

按试剂四：试剂二：试剂三应用液 = 46: 2: 2的比例配制，混匀，现用现配，按需配制，配制完成后避光保存。

④ 对照工作液的配制：

按试剂一：试剂二：试剂三应用液 = 46: 2: 2的比例配制，混匀，现用现配，按需配制，配制完成后避光保存。

⑤ 20 μmol/L标准品的配制：

按试剂五：双蒸水=1: 99的比例配制，混匀，现用现配，按需配制。

⑥ 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(μmol/L)	0	1	2	4	6	8	10	12
20 μmol/L 标准品 (μL)	0	10	20	40	60	80	100	120
双蒸水(μL)	200	190	180	160	140	120	100	80

## 样本准备

### ① 样本处理

组织样本：常规匀浆处理(匀浆介质为试剂一)。匀浆后，4°C，10000 × g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。留取部分上清用于蛋白浓度测定。

### 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：0.01-1.2 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
小鼠血清	不稀释	马血清	不稀释
狗血清	稀释 3-5 倍	人血浆	不稀释
大鼠血浆	不稀释	10% 小鼠肝组织	稀释 5-10 倍
10% 大鼠肾组织	稀释 5-10 倍	10% 大鼠肺组织	稀释 5-10 倍

注：稀释液为试剂一。

## 实验关键点

- ① 试剂三应用液避免反复冻融，可分装后-20°C保存。
- ② 工作液配制完成后，必须避光。
- ③ 严格控制反应时间。
- ④ 一次性测试样本（检测孔）的数量需控制在 20 个以下。

## 操作步骤

- ① 标准孔：取 50  $\mu\text{L}$  不同浓度的标准品加入到酶标板孔中。  
测定孔：取 50  $\mu\text{L}$  待测样本加入到酶标板孔中。  
对照孔：取 50  $\mu\text{L}$  待测样本加入到酶标板孔中。
- ② 向步骤①的标准孔和测定孔中加入 50  $\mu\text{L}$  测定工作液。  
向步骤①对照孔中加入 50  $\mu\text{L}$  对照工作液
- ③ 酶标仪振板 5 s，室温静置 2 min。
- ④ 荧光酶标仪上设置激发光波长 535 nm，发射光波长 587 nm，测定各孔荧光值，记为  $F_1$ ，然后于室温下避光静置反应 10 min，相同波长条件下测定各孔荧光值，记为  $F_2$ ，则  $\Delta F_{\text{测定}} = F_2 (\text{测定}) - F_1 (\text{测定})$ ， $\Delta F_{\text{对照}} = F_2 (\text{对照}) - F_1 (\text{对照})$ 。（注意：标准孔不需要求差值，直接取 10 min 测定的荧光值做标准曲线即可）。

## 操作表

	标准孔	测定孔	对照孔
不同浓度的标准品( $\mu\text{L}$ )	50	--	--
待测样本( $\mu\text{L}$ )	--	50	50
测定工作液( $\mu\text{L}$ )	50	50	--
对照工作液( $\mu\text{L}$ )	--	--	50

酶标仪振板 5 s，室温静置 2 min，荧光酶标仪上设置激发光波长 535 nm，发射光波长 587 nm，测定各孔荧光值，记为  $F_1$ ，然后于室温下避光静置反应 10 min，相同波长条件下测定各孔荧光值，记为  $F_2$ ，则  $\Delta F_{\text{测定}} = F_2 (\text{测定}) - F_1 (\text{测定})$ ， $\Delta F_{\text{对照}} = F_2 (\text{对照}) - F_1 (\text{对照})$ 。（注意：标准孔不需要求差值，直接取 10 min 测定的荧光值做标准曲线即可）

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

## 结果计算

标准品拟合曲线:  $y = ax + b$

血清（浆）XOD 活力的计算:

定义: 25°C 条件下, 每升血清或血浆每分钟催化底物产生 1  $\mu\text{moL}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{XOD 活力} = \frac{(\Delta F_{\text{绝对}} - b)}{a \times T \times f} \quad (\text{U/L})$$

组织中 XOD 活力的计算:

定义: 25°C 条件下, 每克组织蛋白每分钟催化底物产生 1  $\mu\text{moL}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{XOD 活力} = \frac{(\Delta F_{\text{绝对}} - b)}{a \times T \times f \times C_{\text{pr}}} \quad (\text{U/gprot})$$

注解:

y: 标准品的绝对荧光值 (标准孔荧光值-空白荧光值, 空白荧光值是标准品浓度为 0 时的荧光值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

$\Delta F_{\text{绝对}}$ : 样本的绝对荧光变化值 ( $\Delta F_{\text{绝对}} = \Delta F_{\text{测定}} - \Delta F_{\text{对照}}$ )

T: 反应时间, 10 min

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

$C_{\text{pr}}$ : 待测样本的蛋白浓度(gprot/L)

## 附录1 关键数据

### 1. 技术参数

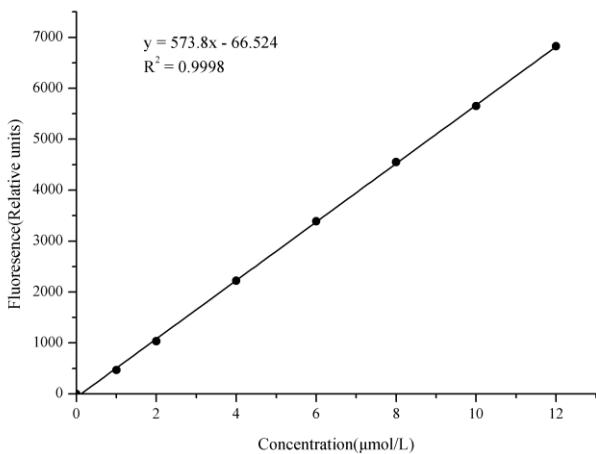
检测范围	0.01 -1.2 U/L	平均批间差	9.0 %
灵敏度	0.01 U/L	平均批内差	4.1 %

### 2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度标准品加样量50 μL, 按照操作步骤进行实验, 荧光值如下表所示:

标准品浓度 (μmol/L)	0	1	2	4	6	8	10	12
荧光值	156	616	1161	2311	3506	4722	5740	7092
	157	634	1224	2443	3581	4693	5874	6873
平均荧光值	156	625	1193	2377	3543	4707	5807	6982
绝对荧光值	0	469	1036	2221	3387	4551	5651	6826

②绘制标曲(如下图):



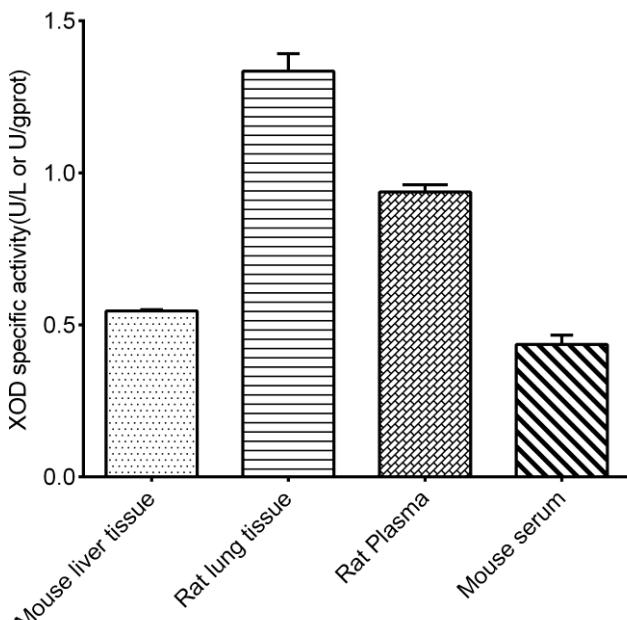
## 附录2 实例分析

例如检测大鼠肺组织(数据仅供参考):

10%大鼠肺匀浆用试剂一稀释10倍，取稀释后的样本50  $\mu\text{L}$ 加入到酶标板孔中，按操作表检测，结果如下：标准曲线为 $y = 591.94 x - 163.41$ ，测定孔平均 $F_1$ 为1847.38，测定孔平均 $F_2$ 为4865.6，则 $\Delta F_{\text{测定}} = 4865.6 - 1847.38 = 3018.22$ ；对照孔平均 $F_1$ 为408.91，对照孔平均 $F_2$ 为475.04，则 $\Delta F_{\text{对照}} = 475.04 - 408.91 = 66.13$ ； $\Delta F_{\text{绝对}} = \Delta F_{\text{测定}} - \Delta F_{\text{对照}} = 3018.22 - 66.13 = 2952.09$ ，测定其蛋白浓度为3.94 gprot/L，计算结果为：

$$\text{XOD 酶活力} = (2952.09 + 163.41) \div 591.94 \div 10 \times 10 \div 3.94 = 1.34 \text{ U/gprot}$$

按照说明书操作，测定小鼠肝组织(10%组织匀浆蛋白含量8.64 gprot/L，稀释10倍，加样量50  $\mu\text{L}$ )、大鼠肺组织(10%组织匀浆蛋白含量3.94 gprot/L，稀释10倍，加样量50  $\mu\text{L}$ )、大鼠血浆(加样量50  $\mu\text{L}$ )、小鼠血清(加样量50  $\mu\text{L}$ )中黄嘌呤氧化酶的活力(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稀释标准品
	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	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数，重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本，重新检测
读数数值低	用不恰当波长检测	选择正确的检测波长
	试剂二未完全解冻	37°C使试剂二完全解冻

### 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。

## 附录4 客户发表文献

1. Du S, Zhou N, Xie G, et al. Surface-engineered triboelectric nanogenerator patches with drug loading and electrical stimulation capabilities: Toward promoting infected wounds healing[J]. *Nano Energy*, 2021, 85:106004. IF:17.087
2. Bartolini D, Arato I, Mancuso F, et al. Melatonin modulates Nrf2 activity to protect porcine pre-pubertal Sertoli cells from the abnormal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation and reductive stress effects of cadmium. *J Pineal Res.* 2022;73 (1):e12806. IF:13.007
3. Yang Z, Wang J, Ai S, et al. Self-generating oxygen enhanced mitochondrion-targeted photodynamic therapy for tumor treatment with hypoxia scavenging[J]. *Theranostics*, 2019, 9(23): 6809. IF:11.556
4. Wan Q, Cao R, Wen G, et al. Sequential use of UV-LEDs irradiation and chlorine to disinfect waterborne fungal spores: Efficiency, mechanism and photoreactivation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 423:127102-. IF:10.588
5. Tian J, Wang L, Hui S, et al. Cadmium accumulation regulated by a rice heavy-metal importer is harmful for host plant and leaf bacteria. *J Adv Res.* 2022. IF:10.479
6. Jg A, Jie S B, Jy B, et al. Comparative toxicity reduction potential of UV/sodium percarbonate and UV/hydrogen peroxide treatments for bisphenol A in water: An integrated analysis using chemical, computational, biological, and metabolomic approaches[J]. *Water Research*, 2020, 190. IF:9.702
7. Yang X X, Xu X, Wang M F, et al. A nanoreactor boosts chemodynamic therapy and ferroptosis for synergistic cancer therapy using molecular amplifier dihydroartemisinin[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20(1):1-19. IF:9.464
8. Liu Z, Liu X, Yang Q, et al. Neutrophil membrane-enveloped nanoparticles for the amelioration of renal ischemia-reperfusion injury in mice[J]. *Acta Biomaterialia*, 2020, 104: 158-166. IF:8.947
9. Huang S, Le H, Hong G, et al. An all-in-one biomimetic iron-small interfering RNA nanoplateform induces ferroptosis for cancer therapy. *Acta Biomater.* 2022;148:244-257. IF:8.291
10. Alharbi YM, Sakr SS, Albarak SM, et al. Antioxidative, Antidiabetic, and Hypolipidemic Properties of Probiotic-Enriched Fermented Camel Milk Combined with Salvia officinalis Leaves Hydroalcoholic Extract in Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11 (4):. IF:7.675

11. Wang H, Huang Q, Zhang Z, et al. Transient post-operative overexpression of CXCR2 on monocytes of traumatic brain injury patients drives monocyte chemotaxis toward cerebrospinal fluid and enhances monocyte-mediated immunogenic cell death of neurons in vitro[J]. Journal of Neuroinflammation, 2022. IF:7.573
12. Liu P, Yin Z, Chen M, et al. Cytotoxicity of adducts formed between quercetin and methylglyoxal in PC-12 cells[J]. Food Chemistry, 2021, 352(2):129424. IF:7.514
13. Adhikari B, Adhikari M, Ghimire B, et al. Cold plasma seed priming modulates growth, redox homeostasis and stress response by inducing reactive species in tomato (*Solanum lycopersicum*)[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2020, 156: 57-69. IF:7.376
14. Zhao X, Wang C, Dai S, et al. Quercetin Protects Ethanol-Induced Hepatocyte Pyroptosis via Scavenging Mitochondrial ROS and Promoting PGC-1  $\alpha$  -Regulated Mitochondrial Homeostasis in L02 Cells. Oxid Med Cell Longev. 2022;2022:4591134. IF:7.31
15. Chagas TQ, Freitas N, Montalvao MF, Nobrega RH, Machado MRF, Charlie-Silva I, Araújo APDC, Guimarães ATB, Alvarez TGDS, Malafaia G. Multiple endpoints of polylactic acid biomicroplastic toxicity in adult zebrafish (*Danio rerio*)[J]. Chemosphere. 2021 Aug;277:130279. IF:7.086
16. Mlindeli Gamede, Lindokuhle Mabuza, Phikelelani Ngubane, et al. Preventing the onset of diabetes-induced chronic kidney disease during prediabetes: The effects of oleanolic acid on selected markers of chronic kidney disease in a diet-induced prediabetic rat model[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2021 Jul;139:111570. IF:6.529
17. Yang H, Zhu Y, Ye Y, et al. Nitric oxide protects against cochlear hair cell damage and noise-induced hearing loss through glucose metabolic reprogramming.[J]. Free radical biology & medicine, 2021. IF:6.525
18. Rao M J, Xu Y, Tang X, et al. CsCYT75B1, a Citrus CYTOCHROME P450 Gene, Is Involved in Accumulation of Antioxidant Flavonoids and Induces Drought Tolerance in Transgenic Arabidopsis[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2020, 9(2):161. IF:6.313
19. Liou G G, Hsieh C C, Lee Y J, et al. N-Acetyl Cysteine Overdose Inducing Hepatic Steatosis and Systemic Inflammation in Both Propacetamol-Induced Hepatotoxic and Normal Mice[J]. Antioxidants, 2021, 10(3):442. IF:6.312
20. Wang Y, Chi H, Xu F, et al. Cadmium chloride-induced apoptosis of HK-2 cells via interfering with mitochondrial respiratory chain[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2022, 236:113494-. IF:6.233
21. Obaid QA, Al-Shammari AM, Khudair KK. Glucose Deprivation Induced by Acarbose

- and Oncolytic Newcastle Disease Virus Promote Metabolic Oxidative Stress and Cell Death in a Breast Cancer Model. *Front Mol Biosci.* 2022;9:816510. IF:6.113
- 22. Abdel-Wahab BA, Walbi IA, Albarqi HA, Ali FEM, Hassanein EHM. Roflumilast protects from cisplatin-induced testicular toxicity in male rats and enhances its cytotoxicity in prostate cancer cell line. Role of NF- $\kappa$ B-p65, cAMP/PKA and Nrf2/HO-1, NQO1 signaling[J]. *Food Chem Toxicol.* 2021 May;151:112133. IF:6.023
  - 23. Aljutaily T. Evaluating the Nutritional and Immune Potentiating Characteristics of Unfermented and Fermented Turmeric Camel Milk in Cyclophosphamide-Induced Immunosuppression in Rats. *Antioxidants (Basel).* 2022;11 (4):. IF:5.952
  - 24. Jabbari N, Nawaz M, Rezaie J. Ionizing Radiation Increases the Activity of Exosomal Secretory Pathway in MCF-7 Human Breast Cancer Cells: A Possible Way to Communicate Resistance against Radiotherapy[J]. *International Journal of Molecular Sciences,* 2019, 20(15):3649-. IF:5.923
  - 25. Shanmugarajan D, Girish C, Harivenkatesh N, et al. Antihypertensive and pleiotropic effects of Phyllanthus emblica extract as an add-on therapy in patients with essential hypertension—A randomized double-blind placebo-controlled trial[J]. *Phytotherapy Research,* 2021. IF:5.878
  - 26. Short-Chain Fatty Acid, Sodium Propionate, in Patients on Maintenance Hemodialysis: Beneficial Effects on Inflammatory Parameters and Gut-Derived Uremic Toxins, A Pilot Study (PLAN Study)[J]. *Journal of Clinical Medicine,* 2018. IF:5.688
  - 27. Peng J, Pan J, Mo J, et al. MPO/HOCl Facilitates Apoptosis and Ferroptosis in the SOD1 G93A Motor Neuron of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2022;2022:8217663. IF:5.604
  - 28. Treadmill Exercise Alleviates Brain Iron Dyshomeostasis Accelerating Neuronal Amyloid- $\beta$  Production, Neuronal Cell Death, and Cognitive Impairment in Transgenic Mice Model of Alzheimer's Disease[J]. *Molecular neurobiology,* 2021, 58(7):3208-3223. IF:5.59
  - 29. Aboulhoda, B. E., Rashed, L. A., Ahmed, H., et al. Hydrogen sulfide and mesenchymal stem cells-extracted microvesicles attenuate LPS-induced Alzheimer's disease[J]. *Journal of Cellular Physiology,* 2021, 236(8):5994-6010 IF:5.546
  - 30. Liu W, Jia H, Guan M, et al. Discovery of novel tubulin inhibitors targeting the colchicine binding site via virtual screening, structural optimization and antitumor evaluation. *Bioorg Chem.* 2022;118:105486. IF:5.508