

(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®黄嘌呤氧化酶(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

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 ₂ O ₂ Standard Solution)	1.5 mL×1 支	-20℃ 保存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	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：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℃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℃，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℃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 μL 不同浓度的标准品加入到酶标板孔中。
测定孔：取 50 μL 待测样本加入到酶标板孔中。
对照孔：取 50 μL 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 μL 测定工作液。
向步骤①对照孔中加入 50 μL 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 F₁，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 F₂，则ΔF 测定=F₂（测定）- F₁（测定），ΔF 对照=F₂（对照）- F₁（对照）。（注意：标准孔不要求差值，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(μL)	50	--	--
待测样本(μL)	--	50	50
测定工作液(μL)	50	50	--
对照工作液(μL)	--	--	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ΔF 测定=F ₂ （测定）- F ₁ （测定），ΔF 对照=F ₂ （对照）- F ₁ （对照）。（注意：标准孔不要求差值，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℃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。

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

组织中 XOD 活力的计算:

定义: 25℃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。

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

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_{pr} : 待测样本的蛋白浓度(gprot/L)

附录1 关键数据

1. 技术参数

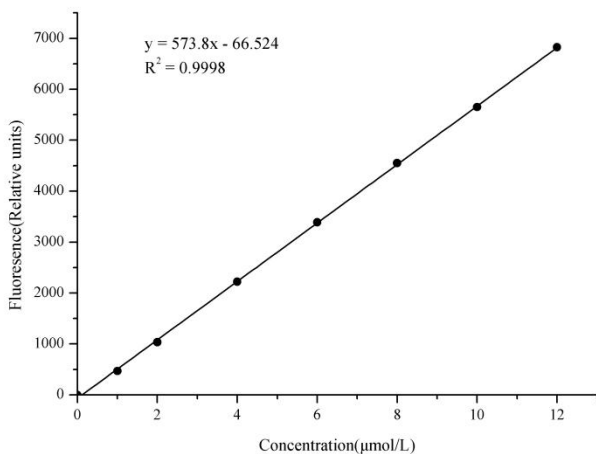
检测范围	0.01 -1.2 U/L	平均批间差	9.0 %
灵敏度	0.01 U/L	平均批内差	4.1 %

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 ($\mu\text{mol/L}$)	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):



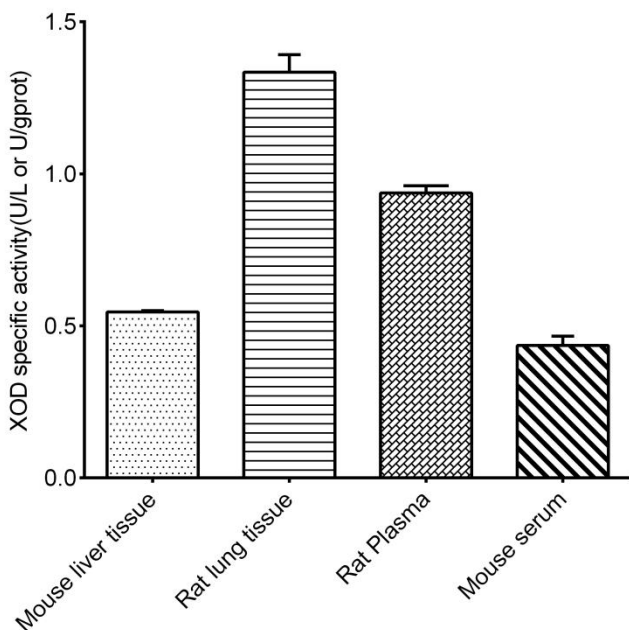
附录2 实例分析

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 μL 加入到酶标板孔中, 按操作表检测, 结果如下: 标准曲线为 $y = 591.94x - 163.41$, 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:

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

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 μL)、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 μL)、大鼠血浆(加样量50 μL)、小鼠血清(加样量50 μL)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℃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 H₂O₂ 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 nanoplatfrom induces ferroptosis for cancer therapy. *Acta Biomater.* 2022;148:244-257. IF:8.291
10. Alharbi YM, Sakr SS, Albarrak 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 α -Regulated Mitochondrial Homeostasis in L02 Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:4591134. IF:7.31
15. Chagas TQ, Freitas ÍN, Montalvão 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- κ 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- β 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