

Amplex Red黄嘌呤氧化酶抑制剂筛选试剂盒

产品编号	产品名称	包装
S0113S	Amplex Red黄嘌呤氧化酶抑制剂筛选试剂盒	100次

产品简介:

- 碧云天研发的Amplex Red黄嘌呤氧化酶抑制剂筛选试剂盒, 即Amplex Red Xanthine Oxidase Inhibitor Screening Kit, 也称Amplex Red XO Inhibitor Screening Kit或Amplex Red XOD Inhibitor Screening Kit, 是一种基于探针Amplex Red利用荧光检测, 简单、快速、灵敏地用于黄嘌呤氧化酶抑制剂高通量筛选的试剂盒。
- 黄嘌呤氧化酶(Xanthine oxidase, XO or XOD)是体内核酸代谢中的一种重要酶, 可以催化次黄嘌呤氧化为黄嘌呤, 并能进一步催化黄嘌呤氧化为尿酸, 同时产生过氧化氢以及超氧化物阴离子的一系列氧化反应, 在包括人类在内的一些物种中的嘌呤分解代谢中起着重要作用[1]。在人类及其它灵长类动物中, XO通常存在于血清、肺、肝脏和肠黏膜中。在啮齿类动物中, XO在大部分组织中均有表达。血液中XO的活性通常都很低。当感染甲型流感时, 血清及肺部的XO活性会增加[2]。当肝功能受损时, XO会大量释放到血液中, 因此检测血液中XO水平被作为一个评估严重肝损伤(例如黄疸)的灵敏指标[3]。XO也可能与痛风的发病机理相关, 黄嘌呤氧化酶是尿酸形成的代谢途径, 因此使用黄嘌呤氧化酶抑制剂别嘌醇用于治疗痛风。此外, 研究显示抑制XO活性可缓解心血管疾病及慢性阻塞性肺疾病[4,5]。
- 本试剂盒的检测原理请参考图1。黄嘌呤(Xanthine)在黄嘌呤氧化酶的催化作用下和氧气发生氧化反应生成尿酸(Uric acid)和 H_2O_2 。本试剂盒提供的XO Probe是一种对 H_2O_2 高度敏感的荧光探针, 在辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)存在的情况下, XO Probe能与 H_2O_2 1:1反应, 产生强烈的红色荧光物质试卤灵(Resorufin)。试卤灵的最大激发波长为571nm, 最大发射波长为585nm, 荧光强度与黄嘌呤氧化酶催化产生的 H_2O_2 的量成正比。如果在反应中加入黄嘌呤氧化酶抑制剂(Inhibitor), 黄嘌呤氧化酶的活性会被抑制, 导致 H_2O_2 的生成量减少, 进而抑制荧光的生成, 荧光强度与抑制剂的抑制效果成反比, 这样就可以检测出抑制剂的抑制效果。

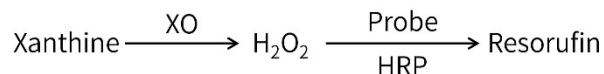


图1. 碧云天Amplex Red黄嘌呤氧化酶抑制剂筛选试剂盒(S0113)的原理图。

- 本试剂盒含抑制剂阳性对照, 使用便捷。**本试剂盒提供XO检测缓冲液(XO Assay Buffer)、黄嘌呤氧化酶(XO)、XO底物(XO Substrate)、阳性对照非布司他(Febuxostat)及可以催化产生荧光需要的探针(XO Probe)和辣根过氧化物酶(HRP)。阳性对照Febuxostat是一种选择性的非嘌呤类XO抑制剂, 临床上常用于痛风及高尿酸血症的治疗。通常Febuxostat的IC50约为2nM-20nM。使用本试剂盒检测Febuxostat的效果请参考图2。

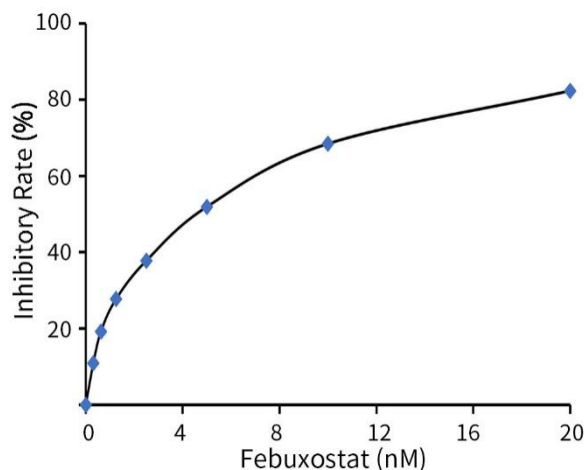


图2. 碧云天Amplex Red黄嘌呤氧化酶抑制剂筛选试剂盒(S0113)检测Febuxostat的效果图。图中Febuxostat的IC50约为5nm。实测结果可能会因样品和检测条件等的不同而存在差异, 图中数据仅作参考。

- 本试剂盒检测速度快, 检测灵敏度高。**相较于黄嘌呤氧化酶抑制剂筛选试剂盒(WST-8法) (S0111), 本试剂盒在检测效率和灵敏度上有更进一步的提升, 整个检测过程约15分钟即可完成。本试剂盒中XO和XO Substrate等的使用量进行了优化, 不仅能检测出IC50很低的抑制剂, 也能检测出IC50较高的抑制剂。

- 碧云天同时提供基于WST-8法的黄嘌呤氧化酶抑制剂筛选试剂盒(S0111)。
- 按照使用说明操作，用于96孔板检测时，本试剂盒的小包装可以进行100次检测。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
S0113S-1	XO Assay Buffer	30ml
S0113S-2	XO Probe	600μl
S0113S-3	XO (20X)	30μl
S0113S-4	HRP (20X)	30μl
S0113S-5	XO Substrate (10X)	60μl
S0113S-6	Febuxostat (10μM)	20μl
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，一年有效。XO Probe和HRP须避光保存。

注意事项：

- XO Probe在空气中不太稳定，开启后应尽快使用，且在使用过程中要注意适当避光。
- XO Probe的反应产物在还原剂的存在下会很不稳定，样品中带入到最终反应体系中的二硫苏糖醇(DTT)或者β-巯基乙醇的浓度须低于10μM。
- 请确保样品的pH值在7-8之间，或者确保加入样品后反应体系的pH值在7-8之间，否则会影响XO Probe的稳定性和荧光值。
- XO Assay Buffer和XO Probe需要完全解冻并平衡至室温后再使用，否则会影响检测结果。XO和HRP使用时应在冰上进行。使用完毕后各试剂应立即按照试剂盒保存的条件进行保存。
- 待测抑制剂的溶剂可能会对检测产生干扰，推荐以XO Assay Buffer、Milli-Q级纯水(ST872)、DMSO (ST038)为溶剂配制、稀释待测抑制剂，并在对照孔中添加与抑制剂等体积的溶剂以排除干扰。如果使用其它溶剂请确保在最终的反应体系中溶剂浓度不应超过5%，如超过5%，请同时设置溶剂对照组以测试溶剂对酶活性的影响，排除干扰。
- XO、HRP、XO Substrate等试剂的量均比较少，在使用前请先适当离心，然后适当混匀后再使用。
- 荧光检测时建议使用96孔黑板(FCP965/FCP966)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 样品的准备：

取适量待测定的抑制剂，用XO Assay Buffer、超纯水、DMSO等适当的溶剂配制成适宜浓度的溶液，如果有必要可以配制成适当的浓度梯度待用。

注1：抑制剂的稀释和配制建议使用同一种溶剂。

注2：XO Assay Buffer需要完全解冻并平衡至室温后再使用。

2. 试剂盒的准备：

a. 平衡除XO和HRP以外的其它所有试剂至室温，略离心使溶液沉淀至管底，再混匀备用。XO Probe、XO Substrate和Febuxostat可37°C水浴0.5-2分钟促进融解。使用完毕后宜立即-20°C保存。

b. XO (1X)的配制：按照每个样品需5μl XO (1X)配制适量的XO (1X)。取适量的XO (20X)，按照1:19的比例加入XO Assay Buffer中。例如10μl XO (20X)加入190μl XO Assay Buffer，混匀即得200μl XO (1X)。配制好的XO (1X)可在冰浴上暂时保存，1小时内酶活性基本稳定。

注：所有涉及XO的操作应在冰上进行。

c. HRP (1X)的配制：按照每个样品需5μl HRP (1X)配制适量的HRP (1X)。取适量的HRP (20X)，按照1: 19的比例加入XO Assay Buffer中。例如10μl HRP (20X)加入190μl XO Assay Buffer，混匀即得200μl HRP (1X)。配制好的HRP (1X) 4°C或冰浴避光保存，当天可使用，但建议尽量现配现用。

d. XO Substrate (1X)的配制：按照每个检测需5μl XO Substrate (1X)配制适量的XO Substrate (1X)。取适量的XO Substrate (10X)，按照1: 9的比例加入XO Assay Buffer中。例如10μl XO Substrate (10X)加入90μl XO Assay Buffer，混匀即得100μl XO Substrate (1X)。配制好的XO Substrate (1X) 4°C或冰浴避光保存，当天可使用，但建议尽量现配现用。

e. Febuxostat溶液(Febuxostat Solution)的配制：本试剂盒提供的阳性对照抑制剂Febuxostat浓度为10μM，可以根据需要，使用与待测抑制剂一样的溶剂稀释至所需浓度或一系列浓度梯度。

3. 样品测定：

a. 参考下表，设置对照孔和样品孔，并按照下表依次加入样品和各溶液。加入待测样品后，混匀，37°C孵育10分钟。

	Blank Control	100% Activity Control	Inhibitor Control	Sample Group
XO Assay Buffer	80μl	75μl	75μl	75μl

XO (1X)	-	5µl	5µl	5µl
Sample Solvent*	5µl	5µl	-	-
Febuxostat Solution	-	-	5µl	-
Test Inhibitors	-	-	-	5µl
37°C, for 10 minutes				

注1: * Sample Solvent(样品溶剂)是指配制和稀释待测抑制剂(Test Inhibitors)所用的溶剂。

注2: 为获得更加可靠的检测结果, 建议每个样品至少应该进行2个重复孔的检测。

b. 每孔加入5µl HRP (1X)。

c. 每孔加入5µl XO Probe。

d. 每孔快速加入5µl XO Substrate (1X), 混匀。

注: 加入XO Substrate (1X)后反应即会开始, 如果孔数较多, 可以在低温下操作或使用排枪操作以减小各孔间加入XO Substrate (1X)的时间差而导致的误差, 可以在培养板振荡器上进行混匀。

e. 37°C孵育5分钟后进行荧光测定。激发波长为560nm, 发射波长为590nm。

注: 当荧光读数偏低时, 也可适当延长孵育时间至10-20分钟。

4. 计算:

a. 计算每个样品孔和对照孔的平均吸光度值, 可分别记录为RFU_{Blank Control}、RFU_{100% Activity Control}、RFU_{Inhibitor Control}和RFU_{Sample}。

b. 计算每个样品的抑制百分率。计算公式如下:

$$\text{抑制率(\%)} = (\text{RFU}_{100\% \text{ Activity Control}} - \text{RFU}_{\text{Sample}}) / (\text{RFU}_{100\% \text{ Activity Control}} - \text{RFU}_{\text{Blank Control}}) \times 100\%$$

c. 对于检测发现有效的抑制剂, 通过检测该抑制剂的剂量效应就可以测定出该抑制剂的IC50。使用本试剂盒检测Febuxostat对于XO的抑制作用的检测结果请参考图2。

参考文献:

- Hille R, Hall J, Basu P. Chem Rev. 2014. 114(7):3963-4038.
- Hemilä H. Br J Nutr. 1992. 67(1):3-16.
- Battelli MG, Musiani S, Valgimigli M, Gramantieri L, Tomassoni F, et al. Am J Gastroenterol. 2001. 96(4):1194-1199.
- Dawson J, Walters M. Br J Clin Pharmacol. 2006. 62(6):633-644.
- Heunks LM, Viña J, van Herwaarden CL, Folgering HT, Gimeno A, et al. Am J Physiol. 1999. 277(6):1697-1704.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
C0016/C0017	乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒	100次/500次
C0018	乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(WST-8法)	100次/500次
S0110S	黄嘌呤氧化酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0111S	黄嘌呤氧化酶抑制剂筛选试剂盒(WST-8法)	100次
S0112S	Amplex Red黄嘌呤氧化酶活性检测试剂盒	100次
S0113S	Amplex Red黄嘌呤氧化酶抑制剂筛选试剂盒	100次
S0114S	黄嘌呤/次黄嘌呤检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0204S	D-乳酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0208S	L-乳酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0211S	Amplex Red胆固醇与胆固醇酯检测试剂盒	100次
S0215S	Amplex Red游离脂肪酸检测试剂盒	100次
S0219S	Amplex Red甘油三酯检测试剂盒	100次
S0223S	Amplex Red甘油检测试剂盒	100次
S0227S	Amplex Red乳酸检测试剂盒	100次
S0231S	Amplex Red尿酸与尿酸酶检测试剂盒	100次
S0235S	Amplex Red磷酸盐检测试剂盒	100次
S0239S	Amplex Red乙醇检测试剂盒	100次
S0243S	Amplex Red黄嘌呤/次黄嘌呤检测试剂盒	100次
S0247S	Amplex Red谷氨酸与谷氨酸氧化酶检测试剂盒	100次
S0251S	Amplex Red过氧化氢与过氧化物酶检测试剂盒	100次
S0255S	Amplex Red过氧化氢酶检测试剂盒	100次
S0259S	Amplex Red单胺氧化酶检测试剂盒	100次
S0263S	Amplex Red鞘磷脂酶检测试剂盒	100次

S0267S	Amplex Red胆碱与乙酰胆碱检测试剂盒	100次
S0271S	Amplex Red乙酰胆碱酯酶检测试剂盒	100次
S0275S	Amplex Red磷脂酰胆碱检测试剂盒	100次
S0279S	Amplex Red磷脂酶D检测试剂盒	100次
S0283S	Amplex Red肌酸检测试剂盒	100次
S0287S	Amplex Red肌酸激酶检测试剂盒	100次
S0291S	Amplex Red肌酸酐检测试剂盒	100次
S0295S	Amplex Red肌酸氨检测试剂盒	100次
S0299S	Amplex Red丙酮酸检测试剂盒	100次
S0303S	Amplex Red丙酮酸激酶检测试剂盒	100次
S0307S	Amplex Red ADP检测试剂盒	100次
S0311S	Amplex Red磷酸烯醇式丙酮酸检测试剂盒	100次
S0315S	Amplex Red丙氨酸检测试剂盒	100次
S0319S	Amplex Red丙氨酸转氨酶检测试剂盒	100次
S0323S	Amplex Red α -酮戊二酸检测试剂盒	100次
S0327S	Amplex Red天冬氨酸检测试剂盒	100次
S0331S	Amplex Red天冬氨酸氨基转移酶检测试剂盒	100次
S0335S	Amplex Red柠檬酸检测试剂盒	100次
S0339S	Amplex Red草酰乙酸检测试剂盒	100次
S0343S	Amplex Red葡萄糖检测试剂盒	100次
S0347S	Amplex Red葡萄糖氧化酶检测试剂盒	100次
S0351S	Amplex Red果糖检测试剂盒	100次
S0355S	Amplex Red乳糖检测试剂盒	100次
S0359S	Amplex Red半乳糖与乳糖检测试剂盒	100次
S0363S	Amplex Red半乳糖与半乳糖氧化酶检测试剂盒	100次
S0367S	Amplex Red麦芽糖检测试剂盒	100次
S0371S	Amplex Red麦芽糖与葡萄糖检测试剂盒	100次
S0375S	Amplex Red糖原检测试剂盒	100次
S0379S	Amplex Red磷酸果糖激酶检测试剂盒	100次
S0383S	Amplex Red乙酰辅酶A检测试剂盒	100次
S0387S	Amplex Red辅酶A检测试剂盒	100次
S0391S	Amplex Red乙酰辅酶A合成酶检测试剂盒	100次
S0511S	L-苹果酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0514S	苹果酸脱氢酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0517S	延胡索酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0520S	延胡索酸酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0523S	异柠檬酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0526S	异柠檬酸脱氢酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0529S	Amplex Red琥珀酸检测试剂盒	100次
S0530S	琥珀酸脱氢酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0532S	Amplex Red琥珀酰辅酶A合成酶检测试剂盒	100次
S0535S	支链氨基酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0538S	N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0540S	酪氨酸检测试剂盒(显色法)	100次
S0542S	酪氨酸酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0545S	酪氨酸酶抑制剂筛选试剂盒(显色法)	100次
S0547S	髓过氧化物酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0548S	Amplex Red髓过氧化物酶活性检测试剂盒	100次
S0550S	Amplex Red髓过氧化物酶抑制剂筛选试剂盒	100次