Amplex Red黄嘌呤氧化酶活性检测试剂盒

产品货号：27057

产品规格：100次/500次

产品简介：

乐业研发的Amplex Red黄嘌呤氧化酶活性检测试剂盒，即Amplex Red Xanthine Oxidase Assay Kit，也称Amplex Red XO Assay Kit或Amplex Red XOD Assay Kit，是一种基于探针Amplex Red利用荧光或吸光度检测，快速、高灵敏地对血清、血浆、尿液等生物体液、细胞培养上清以及组织或细胞样品中黄嘌呤氧化酶活性进行检测的试剂盒。通常0.1-1μl血清或血浆样品就足够用于本试剂盒的荧光法检测。

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。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。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。

本试剂盒中的Amplex Red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，Amplex Red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，并且在激发波长处有很强的可见光吸收。因此本试剂盒可以用吸光度和荧光两种方法来进行检测。

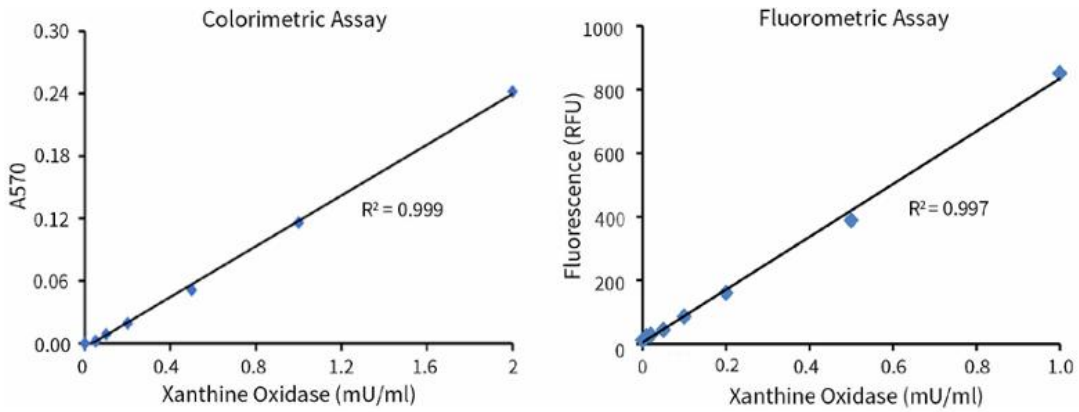
本试剂盒的检测原理请参考图1。在黄嘌呤氧化酶(XO)的催化作用下，黄嘌呤(Xanthine)和氧气发生氧化反应生成尿酸(Uric acid)和H_2O_2，再通过检测H_2O_2与Amplex Red的反应产物试卤灵的荧光强度或吸光度来最终计算黄嘌呤氧化酶的酶活性。试卤灵的荧光强度和吸光度与样品中黄嘌呤氧化酶的活性成正比。

$$\text{Xanthine} + O_2 \xrightarrow{\text{XO}} \text{Uric Acid} + H_2O_2$$

$$\text{Amplex Red} + H_2O_2 \xrightarrow{\text{HRP}} \text{Resorufin (Fluorescent)}$$

图1. 乐业Amplex Red黄嘌呤氧化酶活性检测试剂盒的原理图。

本试剂盒检测灵敏度高，线性范围宽，样品用量少。本试剂盒在样品体积为20μl时，采用吸光度检测可以检测活性低至2μU的黄嘌呤氧化酶，在0.1-2mU/ml (2-40μU)活性范围内有良好的线性关系；采用荧光检测可以检测活性低至0.2μU的黄嘌呤氧化酶，在0.01-1mU/ml (0.2-20μU)活性范围内有良好的线性关系。荧光检测灵敏度比吸光度检测高约10倍，可以使用更少量的样品。本试剂盒提供了配制黄嘌呤氧化酶标准溶液的XO (1U/ml)，可以通过绘制标准曲线(图2)，计算出样品中黄嘌呤氧化酶的活性。



扫一扫 加微信
郑州乐业生物科技有限公司
Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd
地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号
免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799
Q Q：807961520 731791866
邮箱：zzlybio@126.com

图2. Amplex Red黄嘌呤氧化酶活性检测试剂盒检测黄嘌呤氧化酶标准曲线的效果图。左图为吸光度检测，右图为荧光检测。本试剂盒采用吸光度检测时，在0.1-2mU/ml活性范围内有良好的线性关系；采用荧光检测时，在0.01-1mU/ml活性范围内有良好的线性关系。实际检测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

本试剂盒检测方法灵活，检测速度快。相较于黄嘌呤氧化酶活性检测试剂盒(WST-8法)，本试剂盒的检测灵敏度更高、检测方法更加灵活。本试剂盒既可以进行荧光检测，也可进行吸光度检测。整个检测过程约40分钟即可完成。

本试剂盒提供的检测裂解液有一定的通用性。使用本试剂盒中的Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay裂解获得的细胞或组织样品，也可以用于乐业生产的其它代谢类试剂盒中同样使用Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay进行裂解的样品检测，通用性强；而且还可用于检测蛋白浓度、进行SDS-PAGE或一些较易溶解蛋白的Western检测。

本试剂盒适用范围广。本试剂盒可用于小鼠、大鼠、人等的血清、血浆、尿液等生物体液，细胞培养上清、组织或细胞样品等的检测。本试剂盒不仅适合少量样品的检测，也非常适合高通量筛选(High-throughput screening)的自动化操作系统。

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，中包装可以进行500次检测。

产品组成：

产品名称	100次	500次	保存条件
Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay	30ml	120ml	-20°C
XO Assay Buffer	30ml	120ml	-20°C
Amplex Red	200μl	1ml	-20°C，避光
XO (1U/ml)	50μl	250μl	-20°C
XO Developer	200μl	1ml	-20°C，避光
XO Substrate	200μl	1ml	-20°C

使用说明：

1. 样品的准备：

a. 血液样品的准备：对于血清样品，将全血在常温如 25ºC 下放置 30 分钟至 2 小时，不要剧烈摇晃以免溶血，待全血自然凝固并析出血清后，4ºC 约 1000-2000×g 离心 10 分钟，取黄色上清即得血清，注意不要吸取白色或淡黄色沉淀；对于血浆样品，将全血用肝素或者 EDTA 进行抗凝，4ºC 约 1000-2000×g 离心 10 分钟，取黄色或淡黄色上清即得血浆，注意不要吸取白色沉淀。血清和血浆都需置于冰上，如果不能立即检测，也可以分装并短期保存于-20ºC 或-80ºC。对于冻存的样品，在检测前解冻后冰浴存放备用，使用前必须混匀。

b. 细胞或组织样品的准备：对于培养的贴壁细胞，PBS 洗涤一次并吸净残留液体。对于培养的悬浮细胞，先适当离心 (如 100-500×g，5 分钟)收集细胞到离心管内，弃上清并吸净残留液体。按照每 100 万细胞加入 100-200μl Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay 的比例加入裂解液，适当吹打，冰浴 5-10 分钟以充分裂解细胞。4ºC 约 12,000×g 离心 3-5 分钟，取上清用于后续检测。对于组织样品，按照每 10mg 组织加入 100μl Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay 的比例，使用 TissueMaster™高通量组织研磨仪(1.5/2ml×48)、TissueMaster™手持式组织研磨仪或玻璃匀浆器在约 4ºC 或冰浴等低温条件下进行匀浆。4ºC 约 12,000×g 离心 3-5 分钟，取上清用于后续检测。以上所有操作均需在 4ºC 或冰上操作。制备好的细胞或组织样品如果不能立即检测，可以-20ºC 或-80ºC 冻存。

c. 细胞培养上清样品的准备：对于贴壁细胞，直接取培养液；对于悬浮细胞，离心取培养液。

2. 试剂盒的准备：

a. 融解 Amplex Red 和 XO Assay Buffer 并平衡至室温。其它试剂置于冰浴备用，使用完毕后立即按照试剂盒要求的条件保存。

b. Amplex Red Working Solution 的配制：按照每个反应需要 80μl Amplex Red Working Solution 的量配制适量的 Amplex Red Working Solution。均匀混合 74μl XO Assay Buffer、2μl Amplex Red 、2μl XO Developer、2μl XO Substrate，即可配制成 80μl Amplex Red Working Solution。具体配制方法参考下表。配制好的 Amplex Red Working Solution 如果置于 4ºC 或冰浴避光保存，可以在当天使用，但建议尽量现配现用。

Samples	1	10	20	50
XO Assay Buffer (μl)	74	740	1480	3700
Amplex Red (μl)	2	20	40	100
XO Developer (μl)	2	20	40	100
XO Substrate (μl)	2	20	40	100
Amplex Red Working Solution (μl)	80	800	1600	4000

注1：由于酶溶液的用量较少且易沉降，必须注意在使用前先轻轻离心一下，然后适当混匀后再使用。

注2：过氧化氢的存在会对黄嘌呤氧化酶的检测产生干扰。如果样品含有过氧化氢，需同时设置样品背景对照孔，加入不含XO Substrate的Amplex Red Working Solution，即配制Amplex Red Working Solution时2μl XO Substrate用Xanthine Assay Buffer替代。计算时样品孔的读数值需要减去样品背景对照孔的读数。

3. **样品测定：**

a. 黄嘌呤氧化酶标准曲线设置(吸光度检测或荧光检测，可选取其中的一种，对于样品量较少的情况，优先推荐采用荧光检测)。

(a) 吸光度检测：取2μl XO (1U/ml)，加入98μl Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay或XO Assay Buffer (如果检测Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay制备的细胞或组织样品，可以使用Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay；如果检测血液、上清等无需处理的样品，可以使用XO Assay Buffer)，混匀，配制成20mU/ml的XO。再取20μl XO (20mU/ml)，加入180μl Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay或XO Assay Buffer，混匀，配制成浓度为2mU/ml的XO。分别取2mU/ml的XO 0、1、2、5、10、20μl加入96孔板的标准品孔中，并相应地用Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay或XO Assay Buffer补足到20μl，此时，标准曲线的浓度分别0、0.1、0.2、0.5、1、2mU/ml。

注：吸光度检测时建议使用透明96孔板。

(b) 荧光检测：取2μl XO (1U/ml)，加入98μl Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay或XO Assay Buffer (如果检测Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay制备的细胞或组织样品，可以使用Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay；如果检测血液、上清等无需处理的样品，可以使用XO Assay Buffer)，混匀，配制成20mU/ml的XO。再取10μl XO (20mU/ml)，加入190μl Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay或XO Assay Buffer，混匀，配制成浓度为1mU/ml的XO。分别取1mU/ml的XO 0、1、2、4、10、20μl加入96孔板的标准品孔中，并相应地用Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay或XO Assay Buffer补足到20μl，此时，标准曲线的浓度分别0、0.05、0.1、0.2、0.5、1mU/ml。

注：荧光检测时建议使用96孔黑板。

b. 取 1-20μl 稀释后的样品至 96 孔板样品孔中，并相应地再加入 Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay 或 Xanthine Assay Buffer 至样品孔中，补足到 20μl。同时设置仅含 Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay 或 XO Assay Buffer 的孔为空白对照孔。 注：为确保数值在标准曲线范围内，建议将样品同时设定多个稀释倍数。可以进行预实验确定样品的大致浓度，如果数值不在标准曲线范围内，可调整样品的稀释倍数或者增加样品的量。如果检测 Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay 制备的 细胞或组织裂解样品，使用 Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay 稀释；如果检测血液、上清等无需处理的样品，使用 XO Assay Buffer 稀释。此处的样品总稀释倍数记为 n (例如本步骤中对样品进行了 10 倍稀释，加入的“稀释后的样品”为 10μl，则 n=10×20/10=20)。

c. 各孔加入 Amplex Red Working Solution 80μl，混匀，37ºC 反应 30 分钟。

注：如果吸光度偏低或荧光偏弱，可适当延长反应时间，例如反应 45 或 60 分钟。

d. 如果使用吸光度检测，测定 A570；如果使用荧光检测，设置激发波长为 560nm，发射波长为 590nm 进行荧光强度检测。

e. 建立标准曲线，并计算样品中黄嘌呤氧化酶的酶活性(A) ，如果样品的背景对照孔信号比较高，样品的信号值应减去样品背景对照孔的信号值。黄嘌呤氧化酶标准曲线可以参考图 2，吸光度检测在 0.1-2mU/ml 活性范围内有良好的线性关系，荧光检测在 0.01-1mU/ml 活性范围内有良好的线性关系。黄嘌呤氧化酶酶活性计算公式如下：

C (mU/ml) = A × n

注：A为步骤3e根据标准曲线确定的黄嘌呤氧化酶活性；

n为步骤3b样品总稀释倍数。

黄嘌呤氧化酶酶活性单位的定义为：在室温条件下，每分钟催化黄嘌呤产生1.0μmol尿酸和过氧化氢所需的酶量。

注意事项：

1. Amplex Red 在空气中不太稳定，开启后应尽快使用，且在使用过程中须注意适当避光。
2. Amplex Red 的反应产物在还原剂的存在下会很不稳定，因此最终反应体系中的二硫苏糖醇(DTT)、β-巯基乙醇或类似还原剂的浓度应低于 10μM。
3. 请确保反应体系的 pH 值在 7-8 之间，否则会影响 Amplex Red 的稳定性和荧光值。
4. Amplex Red 和 XO Assay Buffer 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。其它溶液使用时应在冰上进行。
5. 血清等样品如在 4ºC 保存，保存时间不得超过 2 周，否则会影响检测结果的准确性。通常血清样品宜-20ºC 保存，-80ºC 保存更佳。
6. 为减少稀释液产生的背景带来的误差，样品和 XO (1U/ml)的稀释液应该根据样品的种类来定。当样品为 Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay 制备的细胞或组织的裂解样品时，应使用 Lysis™ Buffer A for Metabolic Assay 稀释，当样品为血液等其它样品时，应使用 XO Assay Buffer 稀释。
7. 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。
8. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

保存条件：

-20ºC保存，一年有效。Amplex Red和XO Developer须避光保存。