

キサンチンオキシダーゼ (XO) 活性アッセイキット

XO (Xanthine Oxidase) Activity Assay Kit

1kit 42,000円 [X0091]

本製品は生体試料中のキサンチンオキシダーゼ (XO) の活性を測定するキットです。キサンチンオキシダーゼはプリン代謝に関与し、キサンチンやヒポキサンチンを尿酸に変換する重要な酵素であり、痛風、高尿酸血症など様々な酸化ストレスに関連する疾患の研究に用いられます。本製品はキサンチンオキシダーゼの作用によって産生される過酸化水素を測定し、その濃度に基づいたキサンチンオキシダーゼの活性を算出することができます。

特長

- ・高感度で0 - 200 U/L の範囲でXOを検出可能
- ・最大2時間以内で迅速に測定
- ・血清や細胞培養上清など様々な生物試料に対応

キット構成

- ・ 10 x XO Assay Buffer 1vial
- ・ XO Standard 1vial
- ・ XO Substrate Solution 1vial
- ・ XO Enzyme 1vial
- ・ Xanthine Solution 1vial

各96検体分

利用例：X0091を用いたマウス血清XO活性測定

*比色アッセイではXOの活性が200 U/L以下の範囲で測定してください。

- 1 x XO Assay Bufferの調製**
10 x XO Assay Buffer 20 mLと蒸留水 180 mLを混合する。
- 標準曲線の作成**
 - 2.1. XO Standard 1 μ L (H_2O_2) を1 x XO Assay Buffer 102 μ Lと混合し、10 mM H_2O_2 を調製する。
 - 2.2. 右の表のように希釈して H_2O_2 のスタンダードを調製する。
- スタンダードおよびサンプルの準備**
各スタンダードとサンプルを50 μ Lずつ96ウェルプレートに加える。
- 反応混合物の調製**
ウェルの数に応じて各溶液は増やして混合し、1ウェルあたり50 μ Lの反応液を以下の割合で混合する。
 - ・ Xanthine Solution : 2 μ L
 - ・ XO Substrate : 1 μ L
 - ・ XO Enzyme : 1 μ L
 - ・ 1 x XO Assay Buffer : 46 μ L
- 反応の開始**
調製した反応混合物50 μ Lを各ウェルに加え、よく混ぜる。
- 吸光度 (Optical Density : OD) 測定**
 - 6.1. 550 ~ 580 nmで吸光度OD1を速やかに測定する。
 - 6.2. 25 $^{\circ}$ Cで5 ~ 20分間インキュベートし、吸光度OD2を同じ波長で再測定する。
- 活性計算**
 - 7.1. スタンダード希釈系列を用いて検量線を作成し、傾き (Slope) を計算する。
 - 7.2. 反応時間20分間のサンプルの吸光度の変化 $\Delta OD_{Sample} = (OD2 - OD1)$ 値とブランクの吸光度変化 $\Delta OD_{Blank} = (OD2 - OD1)$ を以下の計算式に代入し、XO活性を算出する。

$$\text{XO活性(U/L)} = \frac{\Delta OD_{Sample} - \Delta OD_{Blank}}{\text{傾き} \times \text{反応時間}} \times \text{希釈倍率}$$

【実験例】

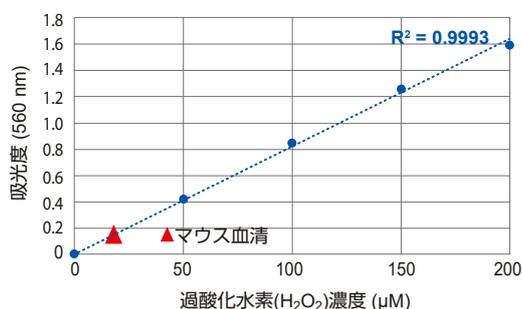
傾き = 0.008196、反応時間 = 20、 $\Delta OD_{Sample} - \Delta OD_{Blank} = 0.1484$ 、希釈倍率 = 10

以上より、比色アッセイに用いたマウス血清中のXO活性は9.05 U/Lと算出された。(測定条件：室温、pH 7.5)

※吸光度が低く、活性がうまく算出できない場合は、反応時間を延ばして測定してください。

No.	10 mM H_2O_2	1 x XO Assay Buffer	終濃度 (μ M)
1	4 μ L	196 μ L	200
2	3 μ L	197 μ L	150
3	2 μ L	198 μ L	100
4	1 μ L	199 μ L	50
5	0 μ L	200 μ L	0

比色アッセイ標準曲線



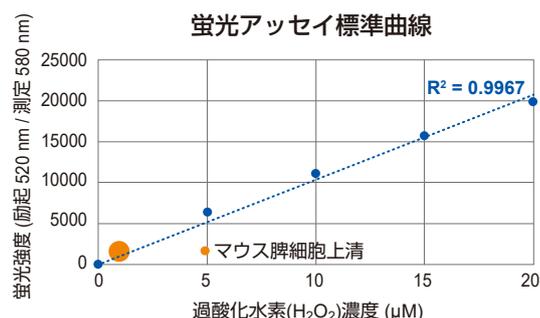
キサンチンオキシダーゼ (XO) 活性アッセイキット

利用例：X0091 を用いたマウス脾細胞上清中のXO活性測定

※蛍光アッセイではXOの活性が0～20 U/Lの範囲で測定してください。

- 1 x XO Assay Bufferの調製**
10 x XO Assay Buffer 20 mLと蒸留水 180 mLを混合する。
- 標準曲線の作成**
 - XO Standard 1 μL (H_2O_2) を1 x XO Assay Buffer 102 μL と混合し、10 mM H_2O_2 を調製する。
 - さらに10 μL の10 mM H_2O_2 を1 x XO Assay Buffer 90 μL と混合し、1 mM H_2O_2 を調製する。
 - 右の表のように希釈して H_2O_2 のスタンダードを調製する。
- スタンダードおよびサンプルの準備**
各スタンダードとサンプルを50 μL ずつ96ウェルプレートに加える。
- 反応混合物の調製**
ウェルの数に応じて各溶液は増やして混合し、1ウェルあたり50 μL の反応液を以下の割合で混合する。
 - Xanthine Solution : 2 μL
 - XO Substrate : 0.1 μL
 - XO Enzyme : 1 μL
 - 1 x XO Assay Buffer : 47 μL
- 反応の開始**
調製した反応混合物 50 μL を各ウェルに加え、よく混ぜる。
- 蛍光強度 (Fluorescent intensity : F) 測定**
 - 励起波長520～550 nm / 蛍光波長585～595 nmで蛍光強度F1を速やかに測定する。
 - 25°Cで10～20分間インキュベートし、蛍光強度F2を同じ波長で再測定する。
- 活性計算**
 - スタンダード希釈系列を用いて検量線を作成し、傾き (Slope) を計算する。
 - 反応時間20分間のサンプルの蛍光強度の変化 $\Delta F_{\text{Sample}} = (F2 - F1)$ と、ブランクの蛍光強度変化 $\Delta F_{\text{Blank}} = (F2 - F1)$ を以下の計算式に代入し、XO活性を算出する。

No.	1 mM H_2O_2	1 x XO Assay Buffer	終濃度 (μM)
1	4 μL	196 μL	20
2	3 μL	197 μL	15
3	2 μL	198 μL	10
4	1 μL	199 μL	5
5	0 μL	200 μL	0



$$\text{XO 活性 (U/L)} = \frac{\Delta F_{\text{Sample}} - \Delta F_{\text{Blank}}}{\text{傾き} \times \text{反応時間}} \times \text{希釈倍率}$$

【実験例】

傾き = 1038.22、反応時間 = 20、 $\Delta F_{\text{Sample}} - \Delta F_{\text{Blank}} = 1494$ 、希釈倍率 = 20

以上より、蛍光アッセイに用いたマウス脾細胞上清中のXO活性は **1.44 U/L** と算出された。(測定条件：室温、pH 7.5)

※蛍光強度が低く、活性がうまく算出できない場合は、反応時間を延ばして測定してください。

東京化成工業株式会社

試薬製品について

■本社営業部 〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町 16-12 T-PLUS 日本橋小伝馬町8階
Tel: 03-3668-0489 Fax: 03-3668-0520 E-mail: Sales-JP@TCIchemicals.com

■大阪営業部 〒541-0041 大阪府大阪市中央区北浜1-1-21 第2中井ビル1階
Tel: 06-6228-1155 Fax: 06-6228-1158 E-mail: osaka-s@TCIchemicals.com

スケールアップ、受託サービス (合成・開発・製造) について

□化成品営業部 〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町 16-12 T-PLUS 日本橋小伝馬町8階
Tel: 03-5651-5171 Fax: 03-5640-8021 E-mail: finechemicals@TCIchemicals.com

弊社製品取扱店

本誌掲載の化学品は試験・研究用にも使用するものです。化学知識のある専門家以外の方のご使用はお避けください。品目や製品情報等、掲載内容の変更を予告なく行う場合があります。内容の一部または全部の無断転載・複製はご遠慮ください。