

研究用試薬

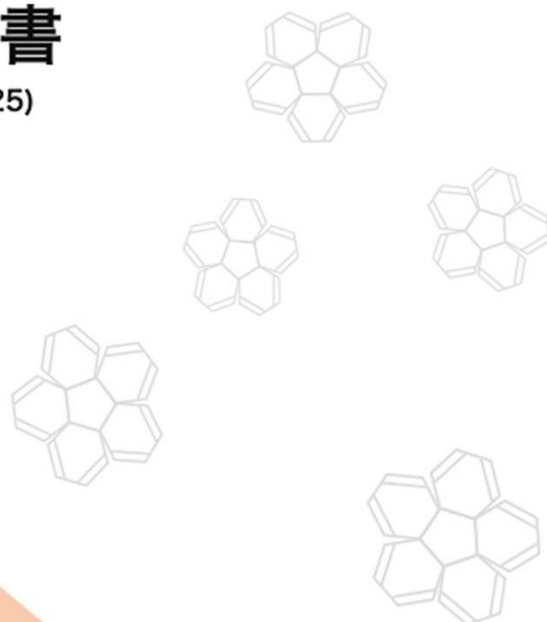


Xanthine Oxidase Inhibitor Screening Kit

Cat. No. SL-4010
(96 tests)

取扱説明書

Ver 1.0 (09/2025)



SAKU|LABSCIENCE

Made in Japan

1 使用目的・本キットの特徴



- 使用目的 ・ Xanthine Oxidase の阻害被験物質の評価・スクリーニング
- 本キットの特徴 ・ 化学発光による測定のため検体の色や蛍光の影響を受けにくい
- 所要時間 ・ 約30分間

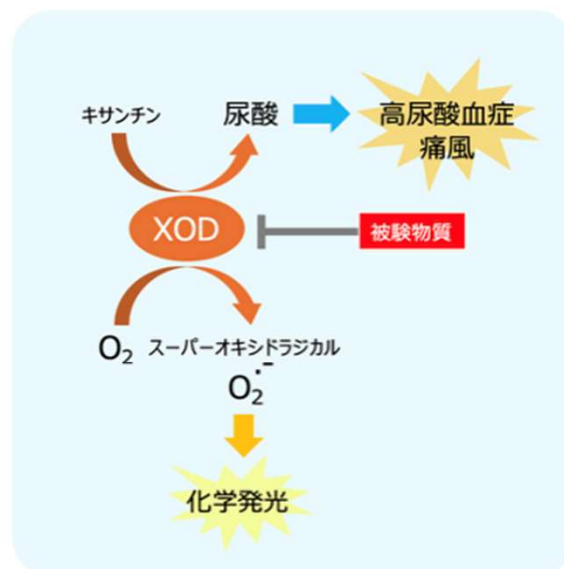
本製品は試験・研究用試薬です。ヒト、動物への治療・臨床診断には使用しないで下さい。

2 背景と測定原理



キサンチンオキシダーゼ (Xanthine oxidase, XOD) は、プリン代謝の酸化還元酵素でヒポキサンチンをキサンチンに、さらにキサンチンを尿酸に触媒する。この過程において尿酸とともに活性酸素種 (スーパーオキシドラジカル) が副産物として生成される。

XODの過剰な活性やプリン代謝異常によって尿酸が過剰に産生されると、尿酸塩結晶が関節内に沈着し、痛風を引き起こす原因となる (高尿酸血症)。一方、XODによって生成される活性酸素種は、生体内の酸化ストレスの一因となり、動脈硬化、虚血再灌流障害、神経変性疾患などの原因になる。そのためXOD活性を抑制する薬剤により高尿酸血症および痛風を軽減する作用が知られている。本製品ではキサンチンオキシダーゼ (牛乳由来) より発生したスーパーオキシドラジカルを化学発光で検出することで被験物質のキサンチンオキシダーゼ阻害作用を検証することができる。



3 製品内容 (96 tests)



	Assay buffer	30 mL
	Enzyme	150 μ L
	Substrate	150 μ L
	Detection	150 μ L
	Inhibitor control (80nM Febuxostat)	500 μ L
	96 well microplate (White plate)	1 plate

4 キット以外に必要なもの



- ・ マイクロプレートリーダー（発光測定）
- ・ マルチチャンネルピペット（1-1000 μ L）
- ・ 1.5mL- 10mL チューブ（試薬調製用）

5 保管と有効期限



- 輸送温度** ドライアイス中で輸送して下さい。
- 使用前（開封前）** -20 $^{\circ}$ Cで保管し、製造日（外袋ラベルに記載）から3ヶ月以内に使用して下さい。
- 使用后（融解後）** 融解後は以下の温度で保存し、製造日から3ヶ月以内に使用して下さい。

	Assay buffer	4 $^{\circ}$ C 保管
	Enzyme	-20 $^{\circ}$ C保管
	Substrate	-20 $^{\circ}$ C保管
	Detection	-20 $^{\circ}$ C保管
	Inhibitor control (80nM Febuxostat)	-20 $^{\circ}$ C保管
	96 well microplate	室温保管

6 試薬の調製



6-1. 試薬の準備

Assay buffer

キット付属のAssay bufferを室温にて融解する。融解後は希釈せずにそのまま使用する。使用后（融解後）は4 $^{\circ}$ Cにて保管。

Enzyme

Detection

Substrate

Inhibitor control

キット付属の Enzyme、Detection、Substrate、Inhibitor control を室温にて融解する。融解後はよく攪拌し使用する。使用後は-20 $^{\circ}$ Cにて保管。

6-2. Enzyme solution (直前調製)



使用直前に使用ウェル数に応じて Enzyme solution を調製する。
調製後の Enzyme solution は室温で保管し、10分以内に使用する。

		1ウェル分の調製量
Enzyme solution	 Assay buffer	49.5 μ L
	 Enzyme (XOD)	0.5 μ L

損失分を考慮し実際は使用量の1.2倍量程度で調製することを推奨

6-3. Detection solution (直前調製)

使用直前に使用ウェル数に応じて Detection solution を調製する。
調製後の Detection solution は室温で保管し、10分以内に使用する。

		1ウェル分の調製量
Detection solution	 Assay buffer	98 μ L
	 Detection	1 μ L
	 Substrate	1 μ L

損失分を考慮し実際は使用量の1.2倍量程度で調製することを推奨

6-4. Sample & Inhibitor control

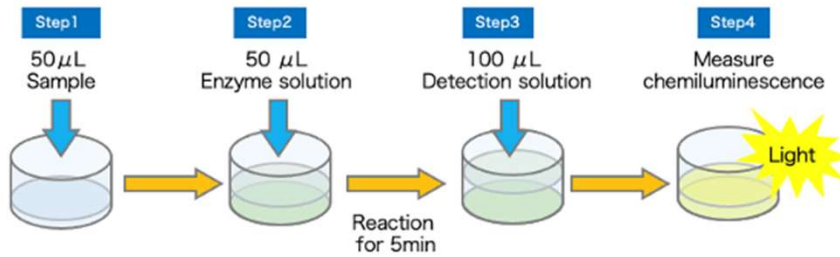
Sample を希釈する場合は各 Assay buffer にて希釈する。
事前に希釈濃度検討を行うことを推奨する。サンプル中の溶媒等の許容濃度を右に示す。溶媒によっては発光値に影響を与えることから使用した溶媒をコントロールとして設定する。

Inhibitor control は希釈せずにそのまま使用する。測定時の終濃度は 20 μ M Febuxostat となる。

溶媒等	サンプル中の最高濃度
Ethanol	2%
DMSO	2%
SDS	1%
Tween20	0.02%
NP40	0.02%
Triton	0.05%
EDTA	0.01M
pH	2-11

7 プロトコール

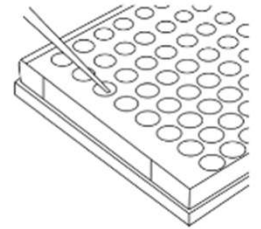
プロトコール概略



Step1. Sampleの添加

付属のマイクロプレートの各ウェルに 50 μ Lの Assay buffer (Control)、Inhibitor control、Sampleを添加する。

サンプルの評価濃度は添加した溶液濃度の 1 / 4 濃度となる。

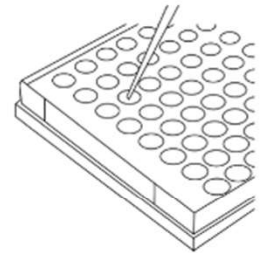


Step2. Enzyme solution の添加

各ウェルに 50 μ Lの Enzyme solution (調製は6-2に記載)を添加し、プレートを軽く攪拌する。

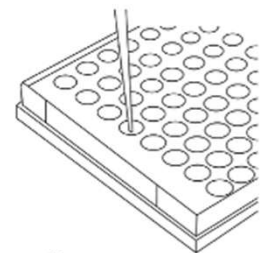


室温で5分間反応



Step3. Detection solutionの添加

各ウェルに 100 μ Lの Detection solution (調製は6-3に記載)を添加し、プレートを軽く攪拌する。



Step4. 相対発光値の測定

測定方法

カイネティック測定機能がある場合 (推奨方法)

ウェルあたりの測定時間: 100 ms - 500ms

測定間隔: 2分間

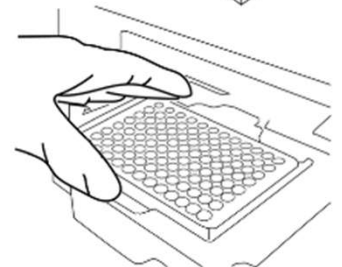
合計測定時間: 10分間 (6回測定)

測定値の算出: カイネティック測定した測定値 (6回分) の合計値 (Total RLU)

カイネティック測定機能がない場合

ウェルあたりの測定時間: 1000 ms

Step2で攪拌後に測定した測定値 (RLUs)



ご使用する機器によって検出感度が異なりますので事前にゲイン調整等の検出感度の検討を行ってください。

8 阻害率の算出



Total RLUsもしくはRLUs から以下の式から消去率を算出する。

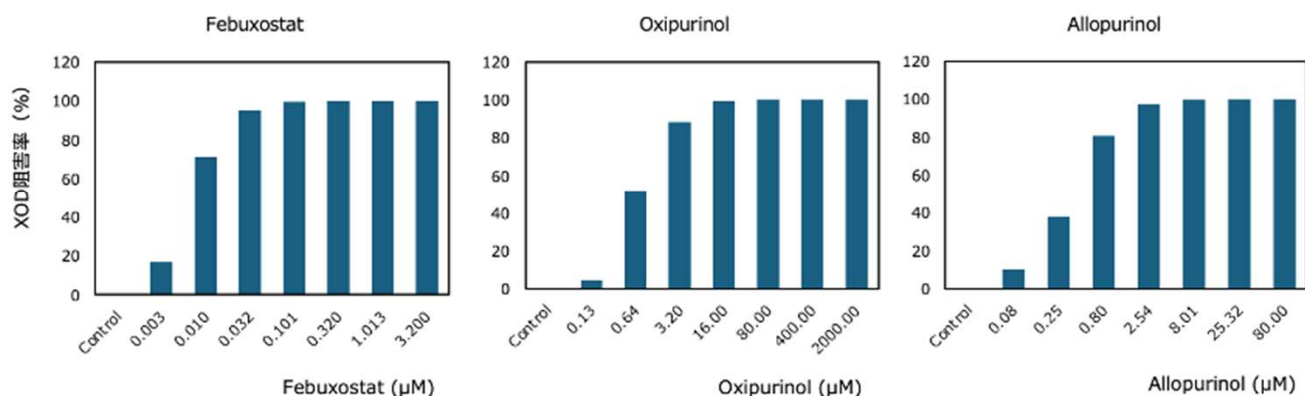
$$\text{阻害率(\%)} = 100 - \frac{\text{Total RLUs (Inhibitor control or Sample)}}{\text{Total RLUs(Control)}} \times 100$$

9 基本データ



代表的 XOD 阻害剤の阻害作用

代表的なXOD阻害剤のXOD阻害活性



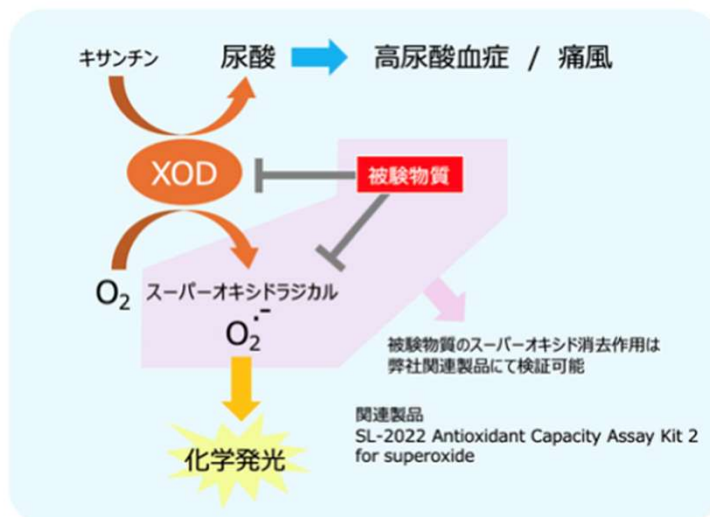
代表的なXOD阻害剤のIC50値

XOD阻害物質	IC50
Allopurinol	400 nM
Oxipurinol	700 nM
Febuxostat	7 nM
Myricetin	500 nM
Quercetin	200 nM

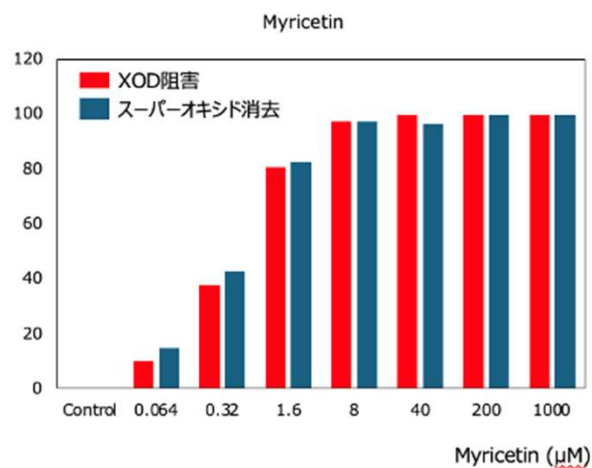
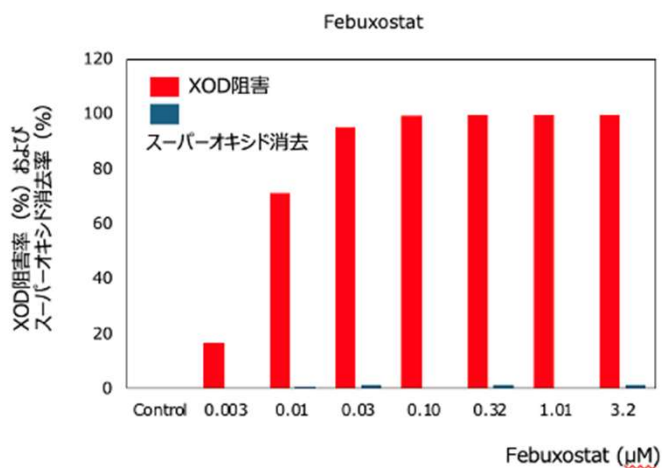
10 抗酸化作用の確認



測定原理上、XODにより生成されたスーパーオキシドを被験物質により消去した場合でもXOD阻害活性として評価される。そこで両者を区別するためにスーパーオキシド抗酸化能検証キット (SL-2022, Antioxidant Capacity Assay Kit2 for superoxide) で抗酸化能の有無を検証することを推奨する。



Febuxostat および Myricetin はともにNOX阻害剤であるがMyricetinは抗酸化作用も持つ。一方、Febuxostatには抗酸化作用は認められなかった。



関連製品
SL-2022 Antioxidant Capacity Assay Kit 2 for Superoxide

製造元



株式会社サクラボサイエンス

〒233-0013 神奈川県横浜市港南区丸山台2-38-34 港南ビル301

TEL/FAX: 045-353-7244

E-mail: info@sakulab-sci.co.jp

HP: <https://sakulab-sci.co.jp/>

