

脂氧合酶（Lipoxygenase, LOX）活性测定试剂盒说明书

(货号: BP10176W 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

脂氧合酶 (LOX, EC 1.13.11.12) 广泛存在于动植物组织中, 催化不饱和脂肪酸氧化反应, 导致膜脂过氧化。在生物体的生长发育、成熟衰老及逆境胁迫过程中具有重要作用。

脂氧合酶 (LOX) 催化亚油酸氧化, 生成的产物在 234nm 处有特征吸收峰; 测定 234nm 处吸光度增加速率, 即可计算得出 LOX 酶活性大小。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂试剂规格	保存方式	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃避光保存	1. 用前摇匀再用; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 再加 1.5mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板 (UV 板)、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

① 组织样本:

取约 0.1g 组织 (水分充足的果实样本可取 0.2-0.3g), 加入 1mL 提取液 (用前摇匀再用), 进行冰浴匀浆, 13000rpm, 4℃离心 15min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若样本颜色较深 (如植物叶片), 可引起起始值 A1 值较大如超过 1.5, 可在样本提取过程中增加除色素步骤: 取约 0.2g 组织 (水分充足的样本可取 1g), 加入 1mL 的 90%乙醇冰浴匀浆, 12000rpm, 4℃离心 10min, 弃掉色素较深的上清液; 以上除色素步骤重复 2 次。最后向离心得到的沉淀中加入 1mL 提取液, 混匀或再次冰浴匀浆, 12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清置冰上待测。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 234nm。

② 所有试剂解冻至室温 (25℃) 或水浴锅 (25℃) 孵育 10min, 试剂一和二可按照比例 180:10 配成反应混合液, 加完样本后可用排枪加 190μL 的反应混合液 (可 4℃存放)。

③ 在 96 孔板 (UV 板) 中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管
样本	10
试剂一	180
试剂二	10
混匀, 室温 (25°C) 下, 于 234nm 处读取 A1, 1min 后读取吸光值 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

- 【注】 1. 若 ΔA 值小于 0.005, 可适当延长反应时间 T (如由 1min 延长到 5min 后或更长) 读取 A2。或适当加大样本量 V1 (如由 10μL 增至 20μL, 则试剂一相应减少), 则改变后的 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。
2. 若起始值 A1 太大如超过 2, 可适当减少样本加样量 V1 (如由 10μL 减至 5μL) 或减少试剂二量 (如由 10μL 减至 5μL), 则试剂一相应增加, 则改变后 V1 需代入公式重新计算。
3. 若 ΔA 值大于 0.2, 则需减少反应时间 T (如减至 30s), 则改变后的 T 需代入公式重新计算。
4. 若上升趋势不稳定, 可以每隔 20S 读取一次吸光值, 选取一段线性上升时间段来参与计算, 相对应的 A 值和 T 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、按照蛋白浓度计算:

定义: 每毫克蛋白每分钟使 A_{234} 吸光值变化 0.05 个单位为 1 个酶活单位(U)。

$$\text{LOX (U/mg prot)} = \Delta A \div (\text{Cpr} \times V1) \div 0.05 \div T = 2000 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按照样本质量计算:

定义: 每克组织每分钟使 A_{234} 吸光值变化 0.05 个单位为 1 个酶活单位(U)。

$$\text{LOX (U/g 鲜重)} = \Delta A \div (W \times V1 \div V) \div 0.05 \div T = 2000 \times \Delta A \div W$$

3、按照细菌/细胞计算:

定义: 每 10^4 个细胞每分钟使 A_{234} 吸光值变化 0.05 个单位为 1 个酶活单位(U)。

$$\text{LOX (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div (500 \times V1 \div V) \div 0.05 \div T = 2000 \times \Delta A \div 500$$

V1---反应体系中样本体积, 10μL=0.01mL; V---提取液体积, 1mL;

T---反应时间, 1min; W---样品质量, g;

500---细菌或细胞数量, 万;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。