

脂氧合酶（LOX）活性测定试剂盒说明书

（货号：G0906F 分光法 48 样）

一、产品简介：

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：

试剂名称	试剂规格	保存方式	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	用前摇匀再用。
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂×1 支	4°C保存	用前甩几下使粉剂落入底部，再加 1mL 蒸馏水溶解备用。

三、所需的仪器和用品：

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿（光径 1cm）、低温台式离心机、可调式移液枪、研钵、冰和蒸馏水。

四、脂氧合酶（LOX）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

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°C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 2，可在样本制备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°C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°C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°C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、上机检测：

① 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 234nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂务必解冻至室温（25°C）或水浴锅（25°C）孵育 10min，试剂一和二可按照比例 750:10 配成混合液（一枪加 760 μ L 该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用）。

③ 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称（ μ L）	测定管
样本	20
试剂一	750
试剂二	10
混匀，室温（25°C）下，立即于 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 20 μ L 增至 50 μ L, 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 20 μ L 减至 10 μ L), 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 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

酶活定义: 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)。

$$\text{LOX (U/mg prot)} = \Delta A \div (\text{Cpr} \times \text{V1}) \div 0.05 \div \text{T} = 1000 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按照样本质量计算

酶活定义: 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)。

$$\text{LOX (U/g 鲜重)} = \Delta A \div (\text{W} \times \text{V1} \div \text{V}) \div 0.05 \div \text{T} = 1000 \times \Delta A \div \text{W}$$

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)。

$$\text{LOX (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div (500 \times \text{V1} \div \text{V}) \div 0.05 \div \text{T} = 1000 \times \Delta A \div 500$$

V1---反应体系中样本体积, 20 μ L=0.02mL; 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。