环氧合酶 （COX) 活性荧光法检测试剂盒说明书

荧光法

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致。

试剂名称	50T规格	100T规格	保存条件
试剂一	液体80mL×1瓶	液体70mL×2瓶	2-8℃保存
试剂二	液体0.08mL×1支	液体0.08 mL×1支	-20℃保存
试剂三	液体0.08 mL×1支	液体0.08 mL×1支	-20℃保存
试剂四	液体0.08mL×1支	液体0.08 mL×1支	2-8℃保存
试剂五	粉剂×1支	粉剂×2支	-20℃保存
试剂六	液体0.08 mL×1支	液体0.08 mL×1支	-20℃保存
试剂七	液体0.08 mL×1支	液体0.08mL×1支	-20℃保存
标准品	液体0.15mL×1支	液体0.15mL×1支	-20℃保存
96孔全黑酶标板	96孔×1块	96孔×1块	_
封板膜(Cat#YA0249)	2张	2张	

溶液的配制：

1、**试剂二：**融化后使用掌上离心机离心至管底， 根据样本量分装，当天使用的常温避光保存，其余的-20℃避光保存，避免反复冻融。

2、**试剂二工作液：**临用前根据样本量按照试剂二：试剂一=2μL:500μL(502μL, 约 7T) 的比例配制试剂二工作液，现用现配，避光保存。

3、**试剂三工作液：**临用前根据样本量按照试剂三：试剂四=5μL:5μL 的比例充分混匀，再加入490μL蒸馏水(500 μL, 10T), 充分混匀，现用现配。（不可三个试剂一起混合）

4、**试剂五：**临用前取一支加入15.5 μL DMSO, 充分溶解，根据样本量分装，当天使用的常温避光保存，其余的-20℃避光可保存3个月，避免反复冻融(该试剂为冻干试剂，可能存在肉眼观察试剂量相差较大甚至量很少的现象，此现象不影响使用，实际质量相同)。

5、**试剂五工作液：**临用前根据样本量按照试剂五：蒸馏水=2μL:198μL(200μL,10T) 的比例配制试剂五工作液，现用现配，避光保存。

6、**试剂六工作液：**临用前根据样本量按照试剂六：DMSO=2μL:8μL 的比例充分混匀，再加入150μL 试剂一(160 μL, 约 5T), 现用现配。（不可三个试剂一起混合）

7、**试剂七工作液：**临用前根据样本量按照试剂七：DMSO=2μL:8μL的比例充分混匀，再加入150μL试剂一(160 μL, 约5T), 现用现配。（不可三个试剂一起混合）

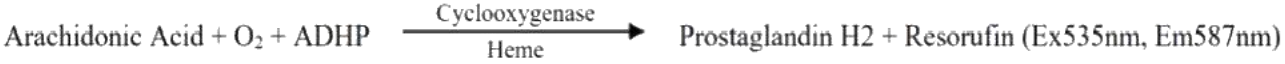
8、**标准品：2mmol**/L 试卤灵。融化后使用掌上离心机离心至管底，当天使用的常温避光保存，其余的-20℃避光分装保存，避免反复冻融。

产品说明：

环氧化酶(Cyclooxygenase,COX,EC1.14.99.1), 亦称前列腺素内氧化酶合成酶(Prostaglandin-endoperoxide synthase, PTGS), 是催化花生四烯酸转化为前列腺素H2的关键限速酶。环氧合酶主要有两种同工酶：COX-1和

COX-2。COX-1为结构性表达，存在于大多数组织中，维持生理功能，如保护胃肠道黏膜、调节肾血流和血小板聚集 。COX-2 则为诱导性表达，通常在炎症、疼痛或细胞损伤时被强烈诱导，是炎症反应和疼痛的关键介质。非甾体抗炎药(如阿司匹林、布洛芬)通过抑制COX活性发挥作用，而选择性COX-2 抑制剂(如塞来昔布)可减少胃肠道副作用。因此，环氧合酶是炎症治疗和药物研发的重要靶点。

花生四烯酸在COX环氧化酶活性作用下转化为前列腺素G2,后者在COX过氧化物酶活性作用下转化为前列腺素H2, 同时荧光探针被氧化生成强荧光产物，通过检测其在激发波长538nm、发射波长587nm的荧光强度计算得到COX活性。在加入COX1抑制剂/COX2抑制剂后，可得到COX2/COX1活性。



注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

荧光酶标仪、天平、低温台式离心机、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、可调式移液枪、恒温培养箱/金属浴、封板膜(赠送)、96孔黑色酶标板(赠送)、 EP管、**DMSO(>98%,A R)**、 冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理(可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献)

1. 组织样本：按照组织质量(g): 试剂一体积(mL) 为1:5~10的比例(建议称取约0.1g组织，加入1mL 试剂一)进行冰浴匀浆。12000g,4℃ 离心15min, 取上清，置冰上待测。
2. 细菌/细胞样本：按照细胞数量(10^7个):试剂一体积(mL) 为1~5:1的比例(建议1000万细菌/细胞加入1mL 试剂一),冰浴超声波破碎细菌/细胞(功率200W, 超声3秒，间隔7秒，总时间3min); 然后12000g, 4℃离心15min, 取上清，置冰上待测。
3. 血清(浆)等液体样本：直接检测。若有浑浊可离心后取上清测定。

二、测定步骤

1、荧光酶标仪预热30min以上，调节至激发波长535nm, 发射波长587nm。

2、标准品的稀释与检测：将2mmolVL(2000μmol/L)标准品用试剂一稀释至0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.02、0.004、0.0008、0.00016、0(空白管) μmol/L,现用现配。在96孔黑色酶标板中加入185μL标准品，于Ex/Em=535nm/587nm处测定荧光值RFU,分别记为RFU标准和RFU空白，计算△RFU标准=RFU标准-RFU(空白管和标准曲线只需做1-2次)。

3、标准品稀释可参考下表：

序号	稀释前浓度(μmol/L)	标准品体积(μL)	试剂一体积(μL)	稀释后浓度(μmol/L)
1	2000	5	495	20
2	20	40	1560	0.5
3	0.5	400	100	0.4
4	0.5	300	200	0.3
5	0.5	200	300	0.2
6	0.5	100	400	0.1
7	0.1	100	400	0.02
8	0.02	100	400	0.004
9	0.004	100	400	0.0008
10	0.0008	100	400	0.00016
11		0	400	0(空白管)

4、在96孔黑色酶标板按下表步骤加样：

试剂名称(μL)	COX测定管	COX-1测定管(选做)	COX-2测定管(选做)
样本	15	15	15
试剂二工作液	70	70	70
试剂一	30	二	二
试剂六工作液		30	一
试剂七工作液		二	30
充分混匀，37℃避光反应15min			
试剂五工作液	20	20	20
试剂三工作液	50	50	50

充分混匀后于Ex/Em=535nm/587nm处测定1min时的荧光值RFU1,分别记为RFU1cox、RFU1cox-1和RFU1cox-2,迅速置于37℃金属浴或恒温培养箱避光反应4min(荧光酶标仪有控温功能可将温度调至37℃),测定5min时的荧光值RFU2,分别记为RFU2cox、RFU2cox.1和RFU2cox-2,计算△RFUcox=RFU2cox-RFU1cox,△RFUcox1=RFU2cox-1-RFU1cox-1,△RFUcox-2=RFU2cox-2-RFU1cox-2。

注：COX-1测定管和COX-2测定管可以根据实验需要选做。只做COX测定管，试剂盒规格是100T/96S;做COX测定管、COX-1测定管或COX-2测定管，试剂盒规格是100T/48S;做COX测定管、COX-1 测定管和COX-2测定管，试剂盒规格是100T/31S。

三、COX活性计算

1. 标准曲线的绘制：

根据标准管浓度(xμmolL) 和荧光值△RFU标准(y,△RFU标准),建立标准曲线。根据标准曲线，将△RFUcox(y, △RFUcox)带入公式计算得到样本浓度(x,μmol/L)。

2. COX活性的计算：

(1)按样本质量计算

单位的定义：每g组织在37℃的反应条件下每分钟催化产生1nmol试卤灵定义为一个酶活力单位。

COX活性(U/g质量)=x×V反总÷(W÷V样总×V样)×1000÷T×F=3.083x÷W×F

(2)按细胞/细菌数量计算

单位的定义：每107个细胞/细菌在37℃的反应条件下每分钟催化产生1nmol试卤灵定义为一个酶活力单位。

COX活性(U/10⁷cell)=x×V 反总÷(N÷V样总×V样)×1000÷T×F=3.083x÷N×F

(3)按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每mg样本蛋白在37℃的反应条件下每分钟催化产生1nmol试卤灵定义为一个酶活力单位。

COX活性(U/mg prot)=x×V反总÷(V样×Cpr)×1000÷T×F=3.083x÷Cpr×F

(4)按血清(浆)等液体体积计算

单位的定义：每L液体样本在37℃的反应条件下每分钟催化产生1nmol试卤灵定义为一个酶活力单位。

COX活性(U/L)=x×V 反总÷V样×1000÷T×F=3083x×F

V反总：反应体系总体积，1.85×10-4L;V 样总：样本中加入试剂一总体积，1mL;V 样：反应体系中加入的样本体积，0.015mL;W: 样本质量，g:N: 细胞/细菌总数，以107计；Cpr. 样本蛋白浓度，mg/mL,蛋白浓度需自行测定；1000:单位转换系数，1μmol=1000nmol;T: 反应时间，4min;F: 样本稀释倍数。

3. COX-1/COX-2活性的计算：

COX-1活性和COX-2活性计算同COX活性。

注意事项：

1. 如果测定值超过标准曲线最大值，可以用**试剂一**稀释样本后再进行测定；如果测定值低于标准曲线最小值，可以增大样本加入量或者延长第二次荧光值测定的时间至10min或者更长；注意同步修改计算公式。
2. 不同荧光酶标仪灵敏度不同，检测得到的荧光值RFU可能存在差异，属于正常现象。确定试剂配制和实验操作无误，标准曲线线性良好，检测结果就是准确有效的。

实验实例：

1. 取 2mmolL(2000μmol/L)标准品，稀释至0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.02、0.004、0.0008、0.00016、0(空白管）μmol/L,检测各标准管荧光值，建立得到标准曲线y=5286.7x+5.7363,R^2=0.9999。

2.不同类型样本检测结果 如下 ：

样本	质量/数量	RFU1	RFU2	活性	单位
小鼠肾脏COX	0.1059g	777.958	2125.046	7.386	U/g质量
小鼠肾脏COX-1	0.1059g	294.312	739.718	2.421	U/g质量
小鼠肾脏COX-2	0.1059g	307.976	817.228	2.773	U/g质量
鸡血清COX		284.751	325.347	20.329	U/L
鸡血清COX-1		15.105	35.952	10.483	U/L
鸡血清COX-2		15.620	44.214	8.563	U/L
HepG2细胞COx	1×107个	61.208	187.288	0.070	U/10^7 cell
HepG2细胞COX-1	1×107个	32.019	88.969	0.030	U/10’cell
HepG2细胞COX-2	1×107个	35.603	97.590	0.033	U/10^7 cell

参考文献：

[1]Liu J,Seibold SA,Rieke CJ,et al.Prostaglandin endoperoxide H synthases:peroxidase hydroperoxide specificity and cyclooxygenase activation [J].Journal ofBiological Chemistry.2007,282(25):18233-18244.

[2]Fujimoto Y,Yonemura T,Sakuma S.Stearic acid potently modulates the activity of cyclooxygenase-1,but not cyclooxygenase-2,in the form ofits CoA ester [J].Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.2008,78(1):81-84.

[3]Van der Auwera A,Peeters LFoubert K,et al.In Vitro Biotransformation and Anti-Inflammatory Activity of Constituents and Metabolites ofFilipendula ulmaria[J].Pharmaceutics.2023,15(4):129.

[4]Liu J,Sun P,Qi X.Reversible and Non-Competitive Inhibition of Cyclooxygenase by Indobufen for Efficient Antiplatelet Action and Relief of Gastrointestinal Irritation [J].Pharmaceutics.2023,15(8):2135.