脂氧合酶（LOX）活性测定试剂盒说明书

(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℃保存	用前摇匀再用。
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×1 支	4℃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℃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℃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。

③ 液体样本：直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。

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℃)或水浴锅(25℃)孵育 10min，试剂一和二可按照比例 750:10 配成混合液（一枪加 760μL 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（μL）	测定管
样本	20
试剂一	750
试剂二	10
混匀，室温（25℃）下，立即于 234nm 处读取 A1，1min 后读取吸光值 A2，△A=A2-A1。	

【注】 1. 若△A 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 20μL 增至 50μL，则试剂一相应减少），则改变后的的 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 20μL 减至 10μL），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)。

LOX (U/mg prot)=△A÷(Cpr×V1)÷0.05÷T=1000×△A÷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)。

LOX (U/g 鲜重)=△A÷(W×V1÷V)÷0.05÷T=1000×△A÷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)。

LOX (U/10^4 cell)=△A÷(500×V1÷V)÷0.05÷T=1000×△A÷500

4、按照液体体积计算：

定义：每毫升液体每分钟使 A_{234} 吸光值变化 0.05 个单位为 1 个酶活单位(U)。

LOX (U/mL)=ΔA÷V1÷0.05÷T=1000×ΔA

V1---反应体系中样本体积，20μL=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。