

脂氧合酶（LOX）活性测定试剂盒说明书

微量法100T/48S

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

LOX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。

测定原理：

LOX催化亚油酸氧化，氧化产物在280nm处有特征吸收峰；测定280nm吸光度增加速率，来计算LOX活性。

自备仪器和样品：

研钵、冰、台式离心机、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板（UV板）、可调式移液枪和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体100mL×1瓶，4℃保存。

试剂二：液体20mL×1瓶，4℃保存。

试剂三：粉剂×1支，4℃保存。

粗酶液提取：

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。16000g，4℃离心20min，取上清置冰上待测。

测定：

1. 分光光度计/酶标仪预热30 min以上，调节波长到280 nm，蒸馏水调零。
2. 在试剂三中加入10mL试剂二（振荡混匀1min），在30℃水浴中预热10 min以上。用不完的试剂4℃保存。
3. **对照管**：依次在微量石英比色皿/96孔板中加入20μL样本和180μL试剂二，30℃反应30min后，记录A对照。
4. **测定管**：依次在微量石英比色皿/96孔板中加入20μL样本和180μL试剂三，30℃反应30min后，记录A测定。
5. $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$

脂氧合酶（LOX）活性测定试剂盒说明书活性计算：

（1）按照蛋白浓度计算

活性单位定义：25℃中每毫克蛋白每分钟催化吸光值变化0.01个单位为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{LOX (U/mg prot)} &= \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \times 100 \\ &= 33.33 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

（2）按照样本质量计算

活性单位定义：25℃中每克组织每分钟催化吸光值变化0.01个单位为1个酶活单位。

$$\text{LOX (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 100$$

$$= 33.33 \times \Delta A \div W$$

Cpr: 上清液蛋白浓度, mg/mL, 需另外测定, 建议使用本公司BCA蛋白质含量测定试剂盒; V反总: 反应体系总体积, 200 μ L=0.2mL; V样: 加入反应体系中上清液体积, 20 μ L=0.02mL; W: 样品质量, g; V样总: 上清液总体积, 1mL; T: 反应时间, 30min。

www.pyram.cn