

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。

自备仪器和用品：

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。(注意：试剂三为微量粉剂可能肉眼看不见，正常溶解即可)
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. $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$

LOX 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。

$$\begin{aligned} \text{LOX (U/g 鲜重)} &= \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 100 \\ &= 33.33 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

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, 200μL=0.2mL; V 样: 加入反应体系中上清液体积, 20μL=0.02mL;

W : 样品质量, g; V 样总: 上清液总体积, 1mL; T: 反应时间, 30min。