

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0408

Size: 100T/96S

植物中脂氧合酶 (LOX) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

LOX 广泛存在于植物组织中, 催化不饱和脂肪酸氧化反应, 导致膜脂过氧化。在植物的生长发育、成熟衰老及逆境胁迫过程中具有重要作用。

二、测定原理:

LOX 催化亚油酸氧化, 氧化产物在 234nm 处有特征吸收峰; 测定 234nm 吸光度增加速率, 来计算 LOX 活性。

三、需自备的仪器和用品:

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 (ZC-1036: UV 板)、可调式移液枪和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加 2ml 试剂二, 充分溶解

五、操作步骤:

● 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 234 nm，蒸馏水调零。
2. 试剂二在 25°C 水浴中预热 30 min 以上。
3. 空白管：依次在微量石英比色皿/96 孔板（UV 板）中加入 20 μL 蒸馏水、160 μL 试剂二和 20 μL 试剂三，迅速混匀后于 234nm 比色，记录 15s 和 75s 的吸光值，分别记为 A1 和 A2。
4. 测定管：依次在微量石英比色皿/96 孔板（UV 板）中加入 20 μL 上清液、160 μL 试剂二和 20 μL 试剂三，迅速混匀后于 234nm 比色，记录 15s 和 75s 的吸光值，分别记为 A3 和 A4。

六、LOX 活性计算：

● 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

（1）按照蛋白浓度计算

活性单位定义：25°C 中每毫克蛋白每分钟催化吸光值变化 0.001 个单位为 1 个酶活单位。

$$\text{LOX (U/mg prot)} = [(A4 - A3) - (A2 - A1)] \times V_{\text{反总}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \times 1000$$

$$= 10000 \times [(A4 - A3) - (A2 - A1)] \div \text{Cpr}$$

（2）按照样本质量计算

活性单位定义：25°C 中每克组织每分钟催化吸光值变化 0.001 个单位为 1 个酶活单位。

$$\text{LOX (U/g)} = [(A4 - A3) - (A2 - A1)] \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000$$

$$= 10000 \times [(A4 - A3) - (A2 - A1)] \div W$$

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 μL=2×10⁻⁴L；V 样：加入反应体系中上清液体积，20 μL=0.02mL；W：样品质量，g；V 样总：上清液总体积，1mL；T：反应时间。

● 使用 96 孔板 (UV 板) 测定的计算公式如下

(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 0.001 个单位为 1 个酶活单位。

$$\text{LOX (U/mg prot)} = [(A4-A3) - (A2-A1)] \times V_{\text{反总}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \times 1000$$

$$= 10\,000 \times [(A4-A3) - (A2-A1)] \div \text{Cpr}$$

(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 0.001 个单位为 1 个酶活单位。

$$\text{LOX (U/g)} = [(A4-A3) - (A2-A1)] \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000$$

$$= 10\,000 \times [(A4-A3) - (A2-A1)] \div W$$

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 μL = $2 \times 10^{-4}\text{L}$; V 样: 加入反应体系中上清液体积, 20 μL = 0.02mL; W : 样品质量, g; V 样总: 上清液总体积, 1mL; T: 反应时间。

七、注意事项:

1. 试剂三易自发氧化, 从而导致空白管测定值偏高, 必须临用前配制, 并且当天使用完毕。
2. 样品处理等过程均需要在冰上进行, 且须在当日完成酶活性测定。