

植物中脂氧合酶（LOX）活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC0325

规格：100T/96S

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
粉剂一	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 3mL×1 瓶	2-8℃保存

溶液的配制：

- 1、提取液：临用前将粉剂一倒入提取液中，溶液为悬浊液，使用前需摇匀。

产品说明：

脂氧合酶（Lipoxygenase, LOX）广泛存在于植物组织中，特别是黄豆种子中。LOX 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。

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。



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：

研钵/匀浆器、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 UV 板、可调式移液枪和蒸馏水。

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）

按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液）进行冰浴匀浆，然后 16000g，4℃，离心 20min，取上清置于冰上待测。

二、测定步骤

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上，调节波长到 234nm，分光光度计蒸馏水调零。
2. 试剂一在 25℃水浴中预热 30min 以上。
3. 空白管：依次在微量石英比色皿/96 孔板中加入 20μL 蒸馏水、160μL 试剂一和 20μL 试剂二，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。空白管只需做 1-2 次。
4. 测定管：依次在微量石英比色皿/96 孔板中加入 20μL 上清液、160μL 试剂一和 20μL 试剂二，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。

三、LOX 活性计算

a.使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 按蛋白浓度计算

活性单位定义：在 1mL 体系下，25°C 中每毫克蛋白每分钟催化吸光值变化 0.001 个单位为一个酶活单位。

LOX 活性 (U/mg prot) = [(A4-A3)-(A2-A1)]÷0.001÷(Cpr×V 样)÷T×V 反总=10000×[(A4-A3)-(A2-A1)]÷Cpr

2. 按样本质量计算

活性单位定义：在 1mL 体系下，25°C 中每克样本每分钟催化吸光值变化 0.001 个单位为一个酶活单位。

LOX 活性(U/g 质量) = [(A4-A3)-(A2-A1)]÷0.001÷(V 样÷V 样总×W)÷T×V 反总=10000×[(A4-A3)-(A2-A1)]÷W

Cpr: 上清液蛋白浓度, mg/mL (需另外测定); W: 样本质量, g; V 样: 加入反应体系中上清液体积, 20μL=0.02mL;

V 样总: 上清液总体积, 1mL; T: 反应时间, 1min; V 反总: 反应总体系, 0.2mL。

b.使用 96 孔 UV 板测定的计算公式如下

3. 按蛋白浓度计算

活性单位定义：在 1mL 体系下，25°C 中每毫克蛋白每分钟催化吸光值变化 0.0006 个单位为一个酶活单位。

LOX 活性 (U/mg prot) = [(A4-A3)-(A2-A1)]÷0.0006÷(Cpr×V 样)÷T×V 反总=16667×[(A4-A3)-(A2-A1)]÷Cpr

4. 按样本质量计算

活性单位定义：在 1mL 体系下，25°C 中每克样本每分钟催化吸光值变化 0.0006 个单位为一个酶活单位。

LOX 活性(U/g 质量) = [(A4-A3)-(A2-A1)]÷0.0006÷(V 样÷V 样总×W)÷T×V 反总=16667×[(A4-A3)-(A2-A1)]÷W

Cpr: 上清液蛋白浓度, mg/mL (需另外测定); W: 样本质量, g; V 样: 加入反应体系中上清液体积, 20μL=0.02mL;

V 样总: 上清液总体积, 1mL; T: 反应时间, 1min; V 反总: 反应体系总体积, 0.2mL。

注意事项:

1. 样本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。
2. 正式实验前做 1~2 个预实验，保证ΔA 的值在 0.02~1.2（微量石英比色皿）/0.01~0.72（96 孔板）范围内；若反应后为明显的悬浊液，则需稀释后再测。
3. 若提取后样本匀浆液颜色过深，可加入 3-5mg 活性炭充分震荡 5min 左右再离心取上清待测，

相关发表文献:

[1] Dou S, Liu S, Xu X, et al. Octanal inhibits spore germination of *Penicillium digitatum* involving membrane peroxidation[J]. *Protoplasma*, 2017, 254(4): 1539-1545.

相关系列产品:

- BC0590/BC0595 游离脂肪酸（FFA）含量检测试剂盒
- BC2340/BC2345 脂肪酶（LPS）活性检测试剂盒
- BC1080/BC1085 乙醇脱氢酶（ADH）活性检测试剂盒
- BC1070/BC1075 丙酮酸脱羧酶（PDC）活性检测试剂盒
- BC0620/BC0625 甘油三酯（TG）含量检测试剂盒
- BC1890/BC1895 游离胆固醇（FC）含量检测试剂盒
- BC0750/BC0755 乙醛脱氢酶（ALDH）活性检测试剂盒