

规格： 100 管/96 样

## 植物中脂氧合酶（LOX）活性测定试剂盒说明书 微量法

**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。

产品内容：

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。

产品说明：

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。

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。

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。

操作步骤：

### 一、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。

### 二、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℃水浴中预热 30 min 以上。
3. 空白管： 依次在微量石英比色皿/96 孔板中加入 20μL 蒸馏水、160μL 试剂二和 20μL 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 孔板中加入 20μL 上清液、160μL 试剂二和 20μL 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。

### 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。

$$\begin{aligned} \text{LOX (U/mg prot)} &= [(A4 - A3) - (A2 - A1)] \times V \text{ 反总} \div (C_{\text{pr}} \times V \text{ 样}) \div T \times 1000 \\ &= 10000 \times [(A4 - A3) - (A2 - A1)] \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(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 0.001 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 $\mu$ L=2 $\times$ 10<sup>-4</sup>L; **V 样:** 加入反应体系中上清液体积, 20 $\mu$ L=0.02mL; **W :** 样品质量, g; **V 样总:** 上清液总体积, 1mL; **T:** 反应时间。

**b. 使用 96 孔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。

$$\text{LOX (U/mg prot)} = [(A4 - A3) - (A2 - A1)] \times V_{\text{反总}} \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T \times 1000$$
$$= 10\,000 \times [(A4 - A3) - (A2 - A1)] \div Cpr$$

(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 $\mu$ L=2 $\times$ 10<sup>-4</sup>L; **V 样:** 加入反应体系中上清液体积, 20 $\mu$ L=0.02mL; **W :** 样品质量, g; **V 样总:** 上清液总体积, 1mL; **T:** 反应时间。

**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。