

植物中脂氧合酶 (LOX) 活性检测试剂盒

Plant Lipoxidase Assay Kit

微量法

货号: AK243

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK243-A	100ml×1 瓶	4℃保存, 含不溶性物质, 使用前混匀即可;
AK243-B	20mL×1 瓶	4℃保存;
AK243-C	粉剂×1 瓶	4℃避光保存; 临用前加入 2mL AK243-B, 充分溶解, 滴加 40ul 0.2mol/L NaOH 至溶液澄清。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 植物中脂氧合酶 (Lipoxidase, 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。

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。

自备用品:

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。

粗酶提取:

按照组织质量 (g): AK243-A 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK243-A) 进行冰浴匀浆。16000g, 4℃离心 20min, 取上清置冰上待测。

测定步骤:

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min, 调节波长到 234 nm, 蒸馏水调零。
2. AK243-B 在 25℃水浴中预热 30 min。
3. 在 1mL 石英比色皿中依次加入下列试剂

试剂名称	空白管 (μL)	测定管 (μL)
蒸馏水	20	
AK243-B	160	
AK243-C	20	
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。		
上清液		20
AK243-B		160
AK243-C		20
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。		

注意: 空白管只需测定一次。

LOX 活性计算公式:

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。

$$\text{LOX 活性 (U/mg prot)} = [(A4-A3)-(A2-A1)] \times V_{\text{反总}} \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T \div 0.001$$

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

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。

$$\text{LOX 活性 (U/g)} = [(A4-A3)-(A2-A1)] \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \div 0.001$$

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

注： 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, 1min。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司: BCA Protein Assay Kit (C05-02001)

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 0.0005 个单位为 1 个酶活单位。

$$\text{LOX 活性 (U/mg prot)} = [(A4-A3)-(A2-A1)] \times V_{\text{反总}} \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T \div 0.0005$$

$$= 20000 \times [(A4-A3)-(A2-A1)] \div Cpr$$

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 0.0005 个单位为 1 个酶活单位。

$$\text{LOX 活性 (U/g)} = [(A4-A3)-(A2-A1)] \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \div 0.0005$$

$$= 20000 \times [(A4-A3)-(A2-A1)] \div W$$

注： 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, 1min。

注意事项：

1. AK243-C 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。