

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-F050

产品规格: 96T

检测仪器: 荧光酶标仪(激发波长 535 nm, 发射波长 587 nm)

Elabscience®环氧合酶(COX)荧光法试剂盒

Cyclooxygenase (COX) Activity Fluorometric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测动物组织样本中 COX, COX-1 和 COX-2 的活力。

检测原理

环氧化酶(Cyclooxygenase, COX)又称前列腺素内氧化酶合成酶(Prostaglandin-endoperoxide synthase, PTGS),是一种同时具有环氧化酶和过氧化氢酶活性的双功能酶。例如,COX的环氧化酶活性可以催化花生四烯酸(Arachidonic Acid, AA)转化为前列腺素 G2(prostaglandin G2, PGG2),而COX的过氧化氢酶活性又可以将前列腺素 G2 转化为前列腺素 H2(prostaglandin H2, PGH2)。

花生四烯酸在环氧合酶催化下生成前列腺素,在辅因子(血红素)作用下环氧合酶开启过氧化物酶活力,使荧光红转化为荧光物质。

本试剂盒检测组织样本时,需测定总蛋白浓度,推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	20 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	0.2 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	稀释液 (Diluent)	0.2 mL×1 支	-20℃ 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	促进剂 (Accelerant)	0.1mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	显色剂 (Chromogenic Agent)	0.1 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	2 mmol/L 标准品 (2 mmol/L Standard)	0.1 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	1 mmol/L 环氧合酶 1 抑制剂 (1 mmol/L COX-1 Inhibitor)	0.3 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂八 (Reagent 8)	1 mmol/L 环氧合酶 2 抑制剂 (1 mmol/L COX-2 Inhibitor)	0.3 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	1 板	
	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：荧光酶标仪(激发波长：535 nm，发射波长：587 nm)，37℃ 恒温箱

试剂：生理盐水 (0.9% NaCl)

试剂准备

① 检测前，所有的试剂平衡至室温。

② 试剂二工作液的配制：

A液：按照试剂二与试剂三=1:1的体积比充分涡旋混匀5 s，按需配制，现配现用，1 h内使用有效。

B液：按照A液：双蒸水=1:49的体积比混匀，得到试剂二工作液，现配现用，30 min内使用有效(建议在孵育15 min时配制)。

③ 显色剂工作液的配制：

按照试剂五：双蒸水=1:99的体积比混匀，现配现用，按需配制，配好的工作液置于冰上避光待用，4 h内使用有效。

④ 20 $\mu\text{mol/L}$ 标准品溶液的配制：

按照试剂六与试剂一1:99的体积比进行混匀得到20 $\mu\text{mol/L}$ 标准品溶液，现配现用，按需配制，置于冰盒上避光保存，2 h内使用有效。

⑤ 反应工作液的配制：

按照试剂一：试剂四=250:1的体积比混匀，避光置于冰盒上，4 h内使用有效。

⑥ 试剂七工作液的配制：

按照试剂一：试剂七=15:1的体积比混匀，现配现用，按需配制，配好的工作液可-20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存1天。

⑦ 试剂八工作液的配制：

按照试剂一：试剂八=15:1的体积比混匀，现配现用，按需配制，配好的可工作液-20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存1天。

⑧ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度($\mu\text{mol/L}$)	0	0.4	0.6	0.8	1.2	1.6	1.8	2.0
20 $\mu\text{mol/L}$ 标准品(μL)	0	10	15	20	30	40	45	50
试剂一(μL)	500	490	485	480	470	460	455	450

样本准备

① 样本处理

组织样本：称取0.02 g组织样本，加入0.18 mL试剂一匀浆，4°C，10000 ×g离心10 min，取上清待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.03-9.66 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%小鼠肝组织	不稀释	10%小鼠肾组织	不稀释
10%大鼠肝组织	1-2	10%大鼠肾组织	1-2

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

- ① 配制好的工作液需在4 h内使用有效；
- ② 若出现样本对照荧光值大于测定荧光值，可以继续稀释样本；
- ③ 若 COX-1 酶活与 COX-2 酶活总和大于 COX 酶活，可以将样本稀释后重新检测。

操作步骤

- ① 标准孔：加入 185 μL 不同浓度标准品溶液；
COX 测定孔：加入 15 μL 样本；
COX-1 测定孔：加入 15 μL 样本；
COX-2 测定孔：加入 15 μL 样本；
对照孔：加入 15 μL 试剂一；
- ② 向①中除标准品外各孔加入 70 μL 反应工作液；
- ③ 向②中 COX 测定孔和对照孔加入 30 μL 试剂一，COX-1 测定孔加入 30 μL 试剂八工作液，COX-2 测定孔加入 30 μL 试剂七工作液；
- ④ 振板 3 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min；
- ⑤ 向④中除标准品外各孔加入 20 μL 显色剂工作液；
- ⑥ 向⑤中除标准品外各孔加入 50 μL 试剂二工作液；
- ⑦ 振板 3 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 10 min，荧光酶标仪于激发波长 535 nm，发射波长 587 nm 处测定各孔荧光值。

操作表

	标准孔	COX 测定孔	COX-1 测定孔	COX-2 测定孔	对照孔
不同浓度标准品(μL)	185	--	--	--	--
样本(μL)	--	15	15	15	--
试剂一(μL)	--	--	--	--	15
反应工作液(μL)	--	70	70	70	70
试剂一(μL)	--	30	--	--	30
试剂八工作液(μL)	--	--	30	--	--
试剂七工作液(μL)	--	--	--	30	--
振板 3 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min。					
显色剂工作液(μL)	--	20	20	20	20
试剂二工作液(μL)	--	50	50	50	50
振板 3 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 10 min，荧光酶标仪于激发波长 535 nm，发射波长 587 nm 处测定各孔荧光值。					

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

标准曲线: $y = ax + b$

① 组织样本中 COX 酶活计算公式:

定义: 37℃ 条件下, 每克组织蛋白每分钟转化生成 1 μmol resorufin 所需要的 COX 酶量为一个活力单位。

$$\text{COX 活力 (U/gprot)} = (F_{\text{测}} - F_{\text{对}} - b) \div a \div T \div C_{\text{pr}} \times 185 \div 15 \times f$$

② 组织样本中 COX-1 酶活计算公式:

定义: 37℃ 条件下, 每克组织蛋白每分钟转化生成 1 μmol resorufin 所需要的 COX-1 酶量为一个活力单位。

$$\text{COX-1 活力 (U/gprot)} = (F_{\text{测1}} - F_{\text{对}} - b) \div a \div T \div C_{\text{pr}} \times 185 \div 15 \times f$$

③ 组织样本中 COX-2 酶活计算公式:

定义: 37℃ 条件下, 每克组织蛋白每分钟转化生成 1 μmol resorufin 所需要的 COX-2 酶量为一个活力单位。

$$\text{COX-2 活力 (U/gprot)} = (F_{\text{测2}} - F_{\text{对}} - b) \div a \div T \div C_{\text{pr}} \times 185 \div 15 \times f$$

注解:

y: 标准孔荧光值-空白孔荧光值(标准品浓度为 0 时荧光值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

F_测: COX 测定孔荧光值

F_{测1}: COX-1 测定孔荧光值

F_{测2}: COX-2 测定孔荧光值

F_对: 对照孔荧光值

T: 反应时间, 10 min

C_{pr}: 组织的蛋白浓度, gprot/L

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

185: 反应总体积, 185 μ L

15: 样本上样体积, 15 μ L

附录1 关键数据

1. 技术参数

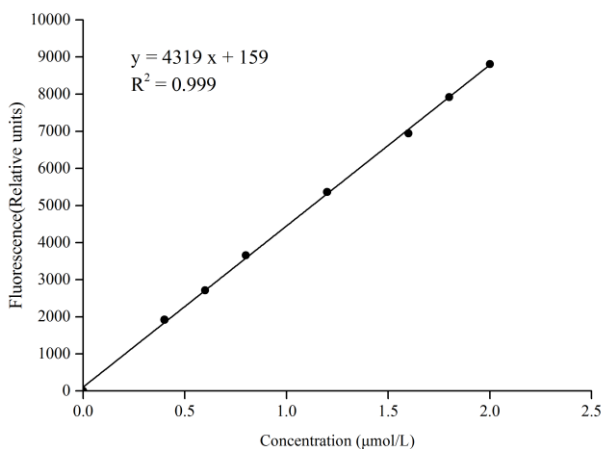
检测范围	0.03-9.66 U/L	批间差	5.0-7.0 %
灵敏度	0.03 U/L	批内差	3.5-5.0 %
稀释回收率	100-106 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量185 μL ，按照操作步骤进行实验，荧光值如下表所示：

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	0.4	0.6	0.8	1.2	1.6	1.8	2.0
荧光值	1	1902	2720	3664	5349	6934	7888	8825
	1	1945	2707	3653	5376	6954	7955	8791
平均荧光值	1	1923	2714	3659	5363	6944	7922	8808
绝对荧光值	0	1922	2713	3657	5362	6943	7921	8807

② 绘制标曲(如下图)：



附录 2 实例分析

例如检测小鼠肝组织样本(数据仅供参考):

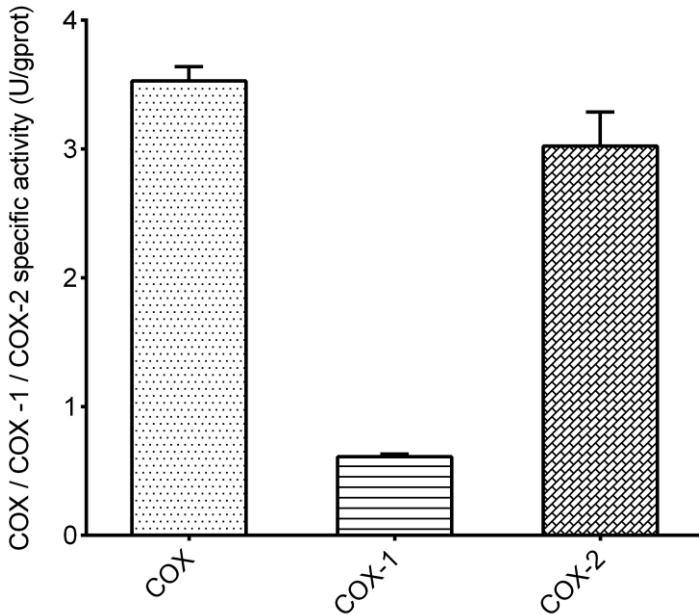
例如检测小鼠肝组织样本, 取 15 μ L 10% 的小鼠肝组织匀浆上清液, 按操作表操作, 结果如下:

标准曲线: $y = 4319x + 159$, COX 测定孔荧光值 $F_{测}$ 为 1007, COX-1 测定孔荧光值 $F_{测1}$ 为 625, 测定 COX-2 平均测定孔荧光值 $F_{测2}$ 为 706, 对照孔平均荧光值为 364, 10% 小鼠肝组织的蛋白浓度为 10.65gprot/L 计算结果为:

$$\text{COX 活性 (U/gprot)} = (1007 - 364 - 159) \div 4319 \div 10 \div 10.65 \times 185 \div 15 \times 2 = 0.026 \text{ U/gprot}$$

$$\text{COX-1 活性 (U/gprot)} = (625 - 364 - 159) \div 4319 \div 10 \div 10.65 \times 185 \div 15 \times 2 = 0.005 \text{ U/gprot}$$

$$\text{COX-2 活性 (U/gprot)} = (706 - 364 - 159) \div 4319 \div 10 \div 10.65 \times 185 \div 15 \times 2 = 0.0127 \text{ U/gprot}$$



声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

