（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-F077

产品规格：48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器：荧光酶标仪(激发波长 507 nm，发射波长 547 nm)

Elabscience®脂氧合酶(LOX)荧光法测试盒

Lipoxygenase (LOX) 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血清(浆)、动物组织和细胞样本中的脂氧合酶(LOX)的活力。

检测原理

脂氧合酶（Lipoxygenase，LOX）是一种含铁的氧化还原酶，存在于动、植物体内。本试剂盒检测原理为：LOX 催化花生四烯酸氧化生成荧光产物，根据单位时间内荧光产物在激发波长 507 nm，发射波长 547 nm 处的荧光值变化，即可计算 LOX 的酶活。

本试剂盒检测动物组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法（货号：E-BC-K318-M）。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	7 mL×1 瓶	14 mL×1 瓶	-20ºC 避光保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	0.7 mL×1 支	1.4 mL×1 支	-20ºC 避光保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	探针 (Probe)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20ºC 避光保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	探针溶液 (Probe Solution)	0.15 mL×1 支	0.3 mL×1 支	-20ºC 避光保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	1 mmol/L 标准品 (1 mmol/L Standard)	0.1 mL×1 支	0.1 mL×1 支	-20ºC 避光保存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	96 孔×1 块		无要求
	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 507 nm，发射波长 547 nm)、恒温箱。

试剂：生理盐水(0.9% NaCl)

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温(25°C)。

② 试剂二工作液的配制：

按试剂一：试剂二的体积比=10 : 1的比例配制，现配现用，1 h内使用有效，按需配制。

③ 试剂三工作液的配制：

取一支试剂三，加入0.09 mL试剂四混匀，配制好的试剂三工作液-20°C避光可保存2周。

④ 反应工作液的配制：

按试剂二工作液：试剂三工作液=100 : 1的比例配制反应工作液，现配现用，1 h内使用有效，按需配制。

⑤ 10 μmol/L标准品的配制：

取 10 μL 试剂五，加入 0.99 mL 双蒸水稀释混匀，未使用完的试剂-20°C避光可保存 2 周。

⑥ 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（μmol/L）	**0**	**2**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**10**
10 μmol/L 标准品（μL）	0	40	80	100	120	140	160	200
双蒸水（μL）	200	160	120	100	80	60	40	0

样本准备

① 样本处理

血清(浆)样本：直接测定。

组织样本：按照组织样本质量（g）：生理盐水（0.9% NaCl）体积（mL）=1：9的比例匀浆，4ºC，10000 × g离心10 min，取上清液置于冰上待测，当天检测有效。留取部分上清进行蛋白浓度测定。

细胞样本：取1×10^6个细胞，加入200 μL生理盐水（0.9% NaCl）匀浆，4°C，10000 × g离心10 min，取上清液置于冰上待测，当天检测有效。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：0.05-0.50 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
人血清	50-100	大鼠血清	50-100
10%小鼠肝脏组织	100-200	10%小鼠肾组织	100-200
10%小鼠肺组织	100-200	10%小鼠心组织	100-200
1×10^6 个 HL-60 细胞	不稀释	1×10^6 个 Jurkat 细胞	不稀释

注：稀释液为生理盐水（0.9% NaCl）。

操作步骤

① 标准孔：取 10 μL 不同浓度的标准品溶液，分别加入相应的酶标孔中。测定孔：取 10 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。

② 向步骤①中各孔加入 140 μL 反应工作液。

③ 振板 5 s，立即使用荧光酶标仪于激发波长 507 nm，发射波长 547 nm 检测各孔的荧光值 F_1。

④ 37°C 避光孵育 20 min，检测各孔的荧光值 F_2，标准曲线以标准孔 F_1 值进行拟合。

操作表

	标准孔	**测定孔**
不同浓度标准品溶液(μL)	10	--
待测样本(μL)	--	10
反应工作液(μL)	140	140
振板 5 s，立即使用荧光酶标仪于激发波长 507 nm，发射波长 547 nm 检测各孔的荧光值 F_1。		
37°C 避光孵育 20 min，检测各孔的荧光值 F_2，标准曲线以标准孔 F_1 值进行拟合。		

本试剂盒检测动物组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法（货号：E-BC-K318-M）。

结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

① 血清(浆)样本中脂氧合酶（LOX）酶活计算公式：

定义：37°C 条件下，每升血清(浆)在反应体系中每分钟生成 1 μmol 产物定义为一个酶活力单位。

$$\text{LOX 活力 (U/L)} = (\Delta F - b) \div a \times f \div T$$

② 动物组织或细胞样本中脂氧合酶（LOX）酶活计算公式：

定义：37°C 条件下，每克组织或细胞蛋白在反应体系中每分钟生成 1 μmol 产物定义为一个酶活力单位。

$$\text{LOX 活力 (U/gprot)} = (\Delta F - b) \div a \div C_{pr} \times f \div T$$

注解：

y：标准品荧光值-空白荧光值(标准品浓度为 0 时的荧光值，标准曲线以标准孔 F_1 值进行拟合)

x：标准品的浓度

a：标曲的斜率

b：标曲的截距

ΔF：样本的绝对荧光值（测定孔变化荧光值($F_2 - F_1$）-空白孔变化荧光值($F_2 - F_1$)）

C_{pr}：待测样本的蛋白浓度，gprot/L

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

T：反应时间，20 min

附录1 关键数据

1. 技术参数

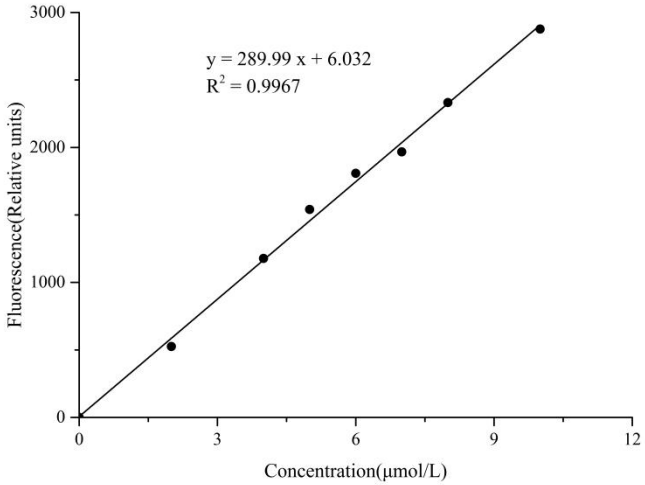
检测范围	0.05-0.50 U/L	**批间差**	6.4-9.4%
灵敏度	0.05 U/L	**批内差**	2.2-4.9%
稀释回收率	99-102%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度标准品加样量10 μL，按照操作步骤进行实验，荧光值如下表所示：

标准品浓度 (μmol/L)	**0**	**2**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**10**
荧光值	2082	2345	2980	3325	3657	3877	4219	4819
	1892	2680	3350	3729	3933	4031	4420	4910
平均荧光值	1987	2513	3165	3527	3795	3954	4320	4865
绝对荧光值	0	525	1178	1540	1808	1967	2332	2877

② 绘制标曲(如下图)：



附录2 实例分析

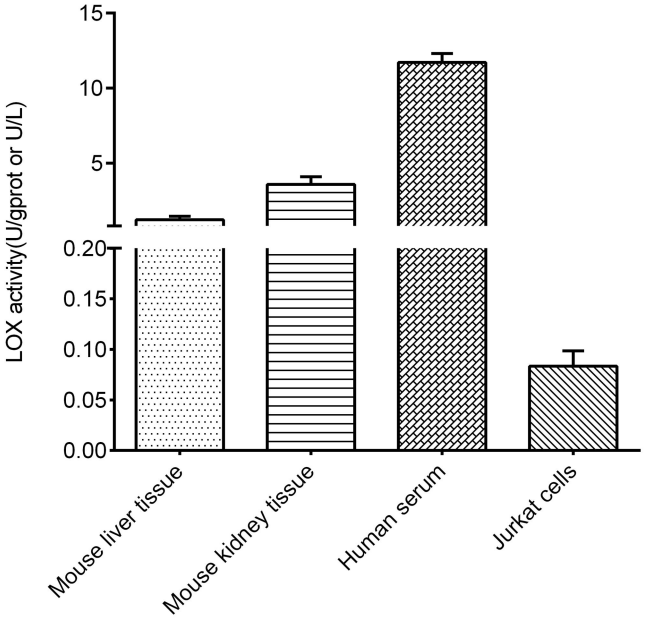
例如检测小鼠肝组织(数据仅供参考)：

取10 μL稀释100倍的10%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 = 289.99 x + 6.032，测定孔F_1平均值为2296，F_2平均值为3694，空白孔F_1平均值为1987，F_2平均值2110，10%小鼠肝组织匀浆蛋白浓度为19.70 gprot/L，计算结果为：

$$\text{LOX活力(U/gprot)} = (3694 - 2296 - 2110 + 1987 - 6.032) \div 289.99 \div 19.70 \times 100 \div 20$$

$$= 1.11 \text{ U/gprot}$$

按说明书操作，测定小鼠肝组织(10%组织匀浆蛋白浓度19.70 gprot/L，稀释100倍，加样量10 μL)、小鼠肾组织(10%组织匀浆蛋白浓度16.17 gprot/L，稀释200倍，加样量10 μL)、人血清(稀释50倍，加样量10 μL)、1×10^6个Jurkat细胞(1×10^6个细胞匀浆蛋白浓度0.82 gprot/L，加样量10 μL)中的LOX活力(如下图)：



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。