

乙醇酸氧化酶活性测定试剂盒说明书 (紫外法 48 样)

一、产品简介:

乙醇酸氧化酶 (GO, EC 1.3.3.1) 是植物光呼吸过程中的关键酶, 它催化乙醇酸氧化生成乙醛酸, 即植物光呼吸的底物。乙醇酸氧化酶与植物光呼吸、生长发育、矿质营养及感病等密切相关。

乙醇酸氧化酶催化乙醇酸氧化成乙醛酸, 生成的乙醛酸与苯胍反应生成乙醛酸苯腙。乙醛酸苯腙 324nm 处有最大吸收峰, 通过测定乙醛酸苯腙的增加量, 即可得出乙醇酸氧化酶的酶活大小。

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 90mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×1 瓶	-20℃保存	临用前甩几下或离心, 使粉体落入底部, 再加 4.6mL 蒸馏水混匀备用
试剂二	粉剂 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下或离心, 使液体落入底部, 再加 3mL 蒸馏水混匀备用

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL石英比色皿(光径1cm)、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、乙醇酸氧化酶(GO)活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。4℃×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

2、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 324nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温 (25℃)。

③ 在 1mL 石英比色皿中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	40
试剂一	80
提取液	640
试剂二	40
混匀, 立即于 324nm 处读取 A1 值, 室温 (25℃) 反应 3min 后读取 A2 值。ΔA=A2-A1。	

【注】 1. 加完试剂二即启动反应, 所以试剂二加完混匀后**立即**检测, 若 A2 值大于 1.5, 可对样本进行稀释, 稀释倍数需代入公式重新计算。

2. 若 ΔA 小于 0.005, 可增大样本量 V1 (如增至 80μL, 提取液相应减少), 或延长反应时间 T (如增至 10min 或更长), 则改变后的 V1 和反应时间 T 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、按质量计算：

酶活定义：每克组织每分钟催化生成 1nmol 的乙醛酸苯腙定义为一个酶活单位。

$$GO(\text{nmol/g/min}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^3] \div (V_1 \div V \times W) \div T \times D = 392.2 \times \Delta A \div W \times D$$

2、按蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克蛋白每分钟催化生成 1nmol 的乙醛酸苯腙定义为一个酶活单位。

$$GO(\text{nmol/g/min}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^3] \div (V_1 \times C_{pr}) \div T \times D = 392.2 \times \Delta A \div C_{pr} \times D$$

ϵ ---乙醛酸苯腙的摩尔吸光系数为17.0mL/ μ mol/cm；

d---光径距离，1cm；

V₂---反应总体积，0.8mL；

V₁---样本上样量，0.04mL；

V---提取液体积，1mL；

W---样本鲜质量，g；

T---反应时间，3min；

D---稀释倍数，若未稀释则 D 值为 1。