

乙醇酸氧化酶活性测定试剂盒说明书

(货号: BP10213F 紫外法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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, 生成的乙醛酸与苯肼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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 90mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉剂 1 瓶	-20℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 4.6mL 蒸馏水混匀备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉剂 1 瓶	4℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 3mL 蒸馏水混匀备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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、检测步骤:

① 紫外分光光度计预热 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:

试剂组分 (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 80 μ L，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。

$$GO(\text{nmol/g/min}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^3] \div (V1 \div V \times W) \div T \times D = 392.2 \times \Delta A \div W \times D$$

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。

$$GO(\text{nmol/g/min}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^3] \div (V1 \times Cpr) \div T \times D = 392.2 \times \Delta A \div Cpr \times D$$

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。