

乙醇酸氧化酶活性测定试剂盒说明书

(货号: BP10213W 微板法 96 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、测试盒组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 120mL×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 2.6mL 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 2.5mL 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)、96 孔板 (UV 板)、离心管、酶标仪、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:

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 酶标仪预热 30 min 以上, 调节波长到 324nm。
- ② 所有试剂解冻至室温 (25℃)。
- ③ 为了减少操作误差, 建议使用排枪。
- ④ 依次在 96 孔板中加入:

试剂组分 (μL)	测定管
样本	10
试剂一	20
提取液	150
试剂二	20

混匀，立即于 324nm 处读取 A1 值，室温（25℃）反应 3min
后读取 A2 值。 $\Delta A = A2 - A1$ 。

- 【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 20 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。

$$GO(\text{nmol/g/min}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^3] \div (V1 \div V \times W) \div T \times D = 784.3 \times \Delta A \div W \times D$$

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。

$$GO(\text{nmol/mg/min}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^3] \div (V1 \times Cpr) \div T \times D = 784.3 \times \Delta A \div Cpr \times D$$

ϵ ---乙醛酸苯腙的摩尔吸光系数为 17.0mL/ μ mol/cm; d---光径距离，0.5cm;

V2---反应总体积，0.2mL;

V1---样本上样量，0.01mL;

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。