

乙醇酸氧化酶（GO）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：BC2015

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×2 瓶	4℃保存
试剂一	液体 15 mL×1 瓶	4℃保存
试剂二	粉剂×2 瓶	-20℃保存
试剂三	液体 2 mL×1 瓶	4℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 2.5 mL 双蒸水溶解，用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

产品说明：

乙醇酸氧化酶（EC1.1.3.15）是乙醇酸循环中的一种酶，也是植物光呼吸代谢中的关键酶，催化乙醇酸氧化生成乙醛酸，通过测定乙醇酸氧化酶活性，可以了解植物光合和呼吸代谢的基本方法。

乙醇酸氧化酶催化乙醇酸氧化生成乙醛酸，乙醛酸和盐酸苯肼反应生成乙醛酸苯腙，在 324nm 有特征吸收峰。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、低温离心机、可调式移液枪、微量石英比色皿/96孔板UV板、天平、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液）进行冰浴匀浆，然后 10000g，4℃，离心 10min，取上清置冰上待测。

细胞或细菌：按照细胞数量（10⁴ 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 10000g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。

二、测定步骤

1. 紫外分光光度计/酶标仪预热30min 以上，调节波长至324nm，紫外分光光度计蒸馏水调零。
2. 将试剂一25℃预热15min。
3. 样本测定：在微量石英比色皿/96孔UV板中分别加入下列试剂：

试剂名称	测定管	空白管
试剂一 (μL)	130	130
蒸馏水 (μL)	-	10
样本 (μL)	10	-
试剂二 (μL)	40	40
试剂三 (μL)	20	20
充分混匀，立即测定324nm处10s和190s吸光值A1和A2，计算ΔA测定管=A2测定-A1测定，ΔA空白管=A2空白-A1空白，ΔA=ΔA测定管-ΔA空白管。（空白管只需做1-2次）		

三、GO 酶活计算

1、按微量石英比色皿计算：

(1) 按蛋白浓度计算

酶活定义：每毫克蛋白每分钟生成 1nmol 乙醛酸苯肼所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{GO 酶活 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 392.16 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本质量计算

酶活定义：每克组织每分钟生成 1nmol 乙醛酸苯肼所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{GO 酶活 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 392.16 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细胞数量计算

酶活定义：每万细胞每分钟生成 1nmol 乙醛酸苯肼所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{GO 酶活 (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times 500 \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.784 \times \Delta A$$

ε：乙醛酸苯肼毫摩尔消光系数：17000L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 反总：反应总体积，2×10⁻⁴L；V 样：反应中样本体积，0.01mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL，蛋白浓度自行测定；W：样本质量，g；T：反应时间，3min；500：500 万个细胞；10⁹：单位换算系数，1mol=10⁹nmol。

2、按 96 孔 UV 板计算：

将上述公式中的 d-1cm 改为 d-0.6cm（96 孔 UV 板光径）进行计算即可。

注意事项：

- 1、测定之前进行预实验，若吸光值 A1>1，请将样本用提取液进行适当的稀释再测定，并在计算公式中乘以稀释倍数。
- 2、色素含量较高的样本，可在提取酶时加活性炭吸附。
- 3、空白管为检测各试剂组分质量的检测孔，正常情况下，其 OD 值变化不超过 0.02。

实验实例：

1. 称取约 0.1g 三叶草组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，然后 10000g，4℃，离心 10min，取上清进行检测，使用微量石英比色皿测得 ΔA 测定管=A2 测定-A1 测定=0.8956-0.7839=0.1117，ΔA 空白管=A2 空白-A1 空白=0.0853-0.077=0.0083，ΔA=ΔA 测定管-ΔA 空白管=0.1117-0.0083=0.1034，按样本质量计算酶活得：
GO 酶活 (U/g 质量) = 392.16 × ΔA ÷ W = 405.4934 U/g 质量。
2. 称取约 0.1g 菠菜组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，然后 10000g，4℃，离心 10min，取上清稀释 2 倍进行检测，使用微量石英比色皿测得 ΔA 测定管=A2 测定-A1 测定=0.9286-0.8105=0.1181，ΔA 空白管=A2 空

白-A1 空白=0.0853-0.077=0.0083, $\Delta A = \Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}} = 0.1181 - 0.0083 = 0.1098$, 按样本质量计算酶活得
GO 酶活 (U/g 质量) = $392.16 \times \Delta A \div W \times 2$ (稀释倍数) = 861.1834 U/g 质量。

相关系列产品:

BC2030/BC2035 异柠檬酸裂解酶 (ICL) 活性检测检测试剂盒

BC4220/BC4225 4-香豆酸: 辅酶 A 连接酶 (4CL) 活性检测试剂盒

