

乙醇酸氧化酶（glycollic oxidase, GO）试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

测定意义

乙醇酸氧化酶（EC1.1.3.1）是植物光呼吸代谢中的关键酶，也是光下合成草酸的关键酶，它催化乙醇酸氧化生成乙醛酸，对研究光呼吸代谢过程及其调控具有重要意义。

测定原理

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。

自备实验用品及仪器

天平、低温离心机、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板（UV板）。

试剂组成和配制

提取液：液体100mL×1瓶，4°C保存。

试剂一：液体15mL×1瓶，4°C保存。

试剂二：粉剂×1瓶，4°C避光保存，临用前加5mL双蒸水溶解；用不完的试剂分装后-20°C保存，禁止反复冻融。

试剂三：液体2mL×1支，4°C保存。

酶液提取

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。12000g，4°C离心10min，取上清，置冰上待测。

测定操作表

	测定管
样本（ μL ）	10
试剂一（ μL ）	130
试剂二（ μL ）	40
试剂三（ μL ）	20
充分混匀，立即于微量石英比色皿/96孔板中测定324nm处10s和190s吸光值A1和A2， $\Delta A = A2 - A1$	

酶活性计算公式

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 按照蛋白浓度计算

酶活性定义：每毫克蛋白每分钟氧化1nmol乙醇酸所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{GO活性 (nmol/min /mg prot)} = \boxed{} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 392 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2. 按照样本质量计算

酶活性定义：每克组织每分钟氧化1 nmol乙醇酸所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{GO活性 (nmol/min /g 鲜重)} = \boxed{} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 392 \times \Delta A \div W$$

ϵ : 乙醛酸苯胺摩尔消光系数: 17L/mmol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 0.2mL; $V_{\text{样}}$: 反应中样本体积, 0.01mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; C_{pr} : 样本蛋白浓度, mg/mL; W, 样本质量, g; T: 反应时间, 3min

b. 用96孔板测定的计算公式如下

1. 按照蛋白浓度计算

酶活性定义：每毫克蛋白每分钟氧化1nmol乙醇酸所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{GO活性 (nmol/min /mg prot)} = \boxed{} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 784 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2. 按照样本质量计算

酶活性定义：每克组织每分钟氧化1nmol乙醇酸所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{GO活性 (nmol/min /g 鲜重)} = \boxed{} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 784 \times \Delta A \div W$$

ϵ : 乙醛酸苯胺摩尔消光系数: 17L/mmol/cm; d: 比色皿光径, 0.5cm; $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 0.2mL; $V_{\text{样}}$: 反应中样本体积, 0.01mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; C_{pr} : 样本蛋白浓度, mg/mL; W, 样本质量, g; T: 反应时间, 3min