乙醇酸氧化酶活性测定试剂盒说明书

（货号：ADS-W-GH006　微板法 96 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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 1 瓶	-20℃保存	临用前甩几下或离心，使粉体落入底部，再加 2.6mL 蒸馏水混匀备用
试剂二	粉剂 1 支	4℃保存	临用前甩几下或离心，使液体落入底部，再加 2.5mL 蒸馏水混匀备用

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板（UV 板）、低温离心机、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：

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 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：

试剂名称（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。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20μL，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(nmol/g/min)=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^3]÷(V1÷V×W)÷T×D=784.3×ΔA÷W×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(nmol/mg/min)=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^3]÷(V1×Cpr)÷T×D=784.3×ΔA÷Cpr×D

ε---乙醛酸苯腙的摩尔吸光系数为17.0mL/μmol/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。