

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℃ 保存。

试剂一: 液体 15mL×1 瓶, 4℃ 保存。

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

试剂三: 液体 2mL×1 支, 4℃ 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℃ 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。

$$\text{GO 活性 (nmol/min /mg prot)} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 392 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

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

ε: 乙醛酸苯胺摩尔消光系数: 17L/mmol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 反总: 反应总体积, 0.2mL; 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; 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。

$$\text{GO 活性 (nmol/min /mg prot)} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 784 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

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

ε: 乙醛酸苯胺摩尔消光系数: 17L/mmol/cm; d: 比色皿光径, 0.5cm; V 反总: 反应总体积, 0.2mL; 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; W, 样本质量, g; T: 反应时间, 3min