

## 乙醇酸氧化酶（glycollic oxidase, GO）试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

**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（EC1.1.3.15）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、1mL 石英比色皿。

### 试剂组成和配制：

提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 35mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 避光保存，临用前加 10mL 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 5mL×1 瓶，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）                                                                     | 50  |
| 试剂一（μL）                                                                    | 650 |
| 试剂二（μL）                                                                    | 200 |
| 试剂三（μL）                                                                    | 100 |
| 充分混匀，立即于 1mL 石英比色皿中测定 324nm 处 10s 和 190s 吸光值 A1 和 A2， $\Delta A = A2 - A1$ |     |

### 酶活性计算公式：

1. 按照蛋白浓度计算

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

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

## 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。

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

$\epsilon$ : 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, 1mL;  $V_{\text{样}}$ : 反应中样本体积, 0.05mL;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 1mL;  $C_{\text{pr}}$ : 样本蛋白浓度, mg/mL;  $W$ , 样本质量, g;  $T$ : 反应时间, 3min

### 注意事项:

1. 测定之前进行预实验, 若吸光值较高, 请将样品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. 色素含量较高的样品, 可在提取酶时加活性炭吸附。