

乙醇酸氧化酶 (glycolate oxidase, GOX) 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。

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

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。

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

ϵ ：乙醛酸苯腙毫摩尔消光系数：17L/mmol/cm；d：比色皿光径，1cm； $V_{\text{反应总}}$ ：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。

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

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。

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

ε : 乙醛酸苯腙摩尔消光系数: 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