

乙醇酸氧化酶 (glycolate oxidase, GOX) 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。

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

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。

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

ϵ ：乙醛酸苯腙摩尔消光系数：17L/mmol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 反总：反应总体积，1mL；V 样：反应中样本体积，0.05mL；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

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。