

乙醇酸氧化酶(GO)检测试剂盒(乙醇酸比色法)

产品简介

光合作用与呼吸作用是植物代谢的两大核心内容，前者是物质合成与能量储存过程，属于同化作用，为包括人类在内的几乎所有生物的生存提供物质来源和能量来源；后者是物质分解与能量释放过程，属于异化作用，为生命提供能量。乙醇酸氧化酶(Glycolate oxidase, GO)是乙醇酸循环的一种酶，在乙醇酸代谢循环中起着非常重要的作用。

乙醇酸氧化酶(GO)检测试剂盒(乙醇酸比色法)检测原理是在弱碱条件下，GO催化乙醇酸氧化生成乙醛酸和过氧化氢，以盐酸半胱氨酸为氢受体，接受乙醇酸氧化时脱下的H⁺，在340nm处有最大吸收，通过紫外分光光度计比色法测定吸光度值的变化，可计算出乙醇酸氧化酶的活性水平，可通过检测植物样本中乙醇酸脱氢酶的活性，进而了解植物的光呼吸作用情况。该试剂盒仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成

名称 \ 编号	ADS066TE0 50T	Storage
试剂(A): GO Lysis Buffer	2 × 500ml	4°C 避光
试剂(B): 蛋白沉淀剂	100g	RT
试剂(C): GO 悬浮液	100ml	RT
试剂(D): GO Assay Buffer	100ml	4°C 避光
试剂(E): GO 启动剂	4ml	4°C
使用说明书	1 份	

自备材料

- 1、研钵或匀浆器、纱布或滤纸、离心管或试管、氮气(备选)
- 2、离心机、pH 计、恒温箱或水浴锅、石英比色杯、紫外分光光度计

操作步骤(仅供参考)

1、准备样品:

a)取新鲜植物叶片，清洗干净，吸水纸吸干，称取9g，加入18ml预冷的GO Lysis Buffer，冰浴情况下充分匀浆或研磨，经纱布或滤纸过滤，将滤液置于离心管或试管中。

b)1000g离心15min，取上清液置于新的离心管或试管，调节pH值至5.4，4000g离心15min，取上清液。

c)按每10ml上清液加入蛋白沉淀剂1.15g的比例混合溶解，不断混匀30min，4000g离心20min，取上清液。

d)按每10ml上清液加入蛋白沉淀剂0.6g的比例混合溶解，不断混匀30min，4000g离心20min，弃上清液，留取沉淀即为乙醇酸氧化酶粗制品。

e)加入适量的GO悬浮液溶解沉淀，使其体积为开始提取液体积的1/10，即为乙醇酸氧化酶粗提液，置于4℃保存待用，可考虑采用BCA蛋白定量法等检测乙醇酸氧化酶粗提液中蛋白质的浓度。

- 2、GO加样：按照下表设置对照管(备选，一般可以不设对照管)、测定管，溶液应按照顺序依次加入，并注意避免产生气泡，如果样品中的乙醇酸氧化酶活性过高，可以减少样品用量或用GO Assay Buffer适当稀释后再进行测定，样品的检测最好能设置平行管。

加入物(ml)	对照管(备选)	测定管
GO Assay Buffer	2	2
GO 粗提液	—	0.2
GO Lysis Buffer	0.2	—
通氮气 30s (备选)，30℃孵育 10min。		

- 3、GO测定：以分光光度计(1cm光径比色杯)测定340nm处吸光度(记为 A_0)，再加入GO启动剂0.07ml，并同时计时，每隔30s测定1次吸光度，共记录10次，以实际测定时间340nm处的吸光度记为 A_1 。**建议加入GO启动剂后立即检测，加样时间越短越好，其反应基本在1~3min内，其后反应趋于平缓。**

注意：该反应系统是利用速率变化，求得相应OD的变化，进一步推算出乙醇酸氧化酶的活性，因此加入GO启动剂立即计时很重要，每次检测指标不宜过多，否则有可能由于操作时间的差异而导致结果有偏差。

计算

$$\text{测定蛋白浓度组织样品GO}(\mu\text{M}/\text{mg} \cdot \text{min}) = \Delta A \times V_T / (5.67 \times \Delta t \times V_S \times C)$$

$$\text{不测蛋白浓度组织样品GO}(\mu\text{M}/\text{g} \cdot \text{min}) = \Delta A \times V_T / (5.67 \times \Delta t \times V_S \times W \times 10)$$

式中： $\Delta A = A_0 - A_1$ (如有必要，可再减去对照最初1min的吸光度变化量)

V_T = 反应液总体积(ml)

5.67 = 每微摩尔半胱氨酸在340nm处光密度

Δt = 实际检测时间之差(min)

V_S = 加入待测样品体积(ml)

C = 酶粗提液中蛋白质的浓度(mg/ml)

W = 待测样品鲜重或干重(g)

10 = GO 悬浮液溶解沉淀，使其体积为开始提取液体积的 1/10

注意事项

- 1、实验材料应尽量新鲜，如取材后不立即测定，应存于-20~-80℃。
- 2、待测样品中不能含有磷酸酶抑制剂，同时需避免反复冻融。
- 3、如果没有分光光度计，也可以使用酶标仪测定，但应考虑酶标仪的最大检测体积。
- 4、该反应系统是利用速率变化，求得相应OD的变化，每次检测指标不宜过多。
- 5、通氮气不是必须步骤，如果没有条件可省略。
- 6、 ΔA 为反应最初几分钟内340nm处吸光度变化的绝对量，如有必要可减去对照液最初1min的吸光度变化量。

有效期: 6个月。低温运输，按要求保存。