

## 乙醇酸氧化酶活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1436

产品规格：100 管/96 样

### 产品简介：

乙醇酸氧化酶（EC1.1.3.15）是乙醇酸循环中的一种酶，也是植物光呼吸代谢中的关键酶，催化乙醇酸氧化生成乙醛酸，通过测定乙醇酸氧化酶活性，可以了解植物光合和呼吸代谢的基本方法。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。注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者 增加样本量进行检测。

### 产品组成：

产品名称	规格	储存条件
提取液	液体 60mL×2 瓶	4℃
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃
试剂二	粉剂×2 瓶	-20℃
试剂三	液体 2mL×1 瓶	4℃

溶液的配制：

1. 试剂二：临用前加入 2.5mL 双蒸水溶解，用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

### 需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、低温离心机、可调式移液枪、微量石英比色皿/96 孔板 UV 板、天平、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

### 操作步骤：

#### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

组织：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，然后 10000g，4℃，离心 10min，取上清置冰上待测。

细胞或细菌：按照细胞数量（ $10^4$  个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 10000g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。

#### 二、测定步骤

1. 紫外分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 324nm，紫外分光光度计蒸馏水调零。
2. 将试剂一 25℃ 预热 15min。
3. 样本测定：在微量石英比色皿/96 孔 UV 板中分别加入下列试剂：

试剂名称	测定管	空白管
试剂一（ $\mu$ L）	130	130
蒸馏水（ $\mu$ L）	-	10
样本（ $\mu$ L）	10	-
试剂二（ $\mu$ L）	40	40
试剂三（ $\mu$ L）	20	20
充分混匀，立即测定 324nm 处 10s 和 190s 吸光值 A1 和 A2，计算 $\Delta A$ 测定管		



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

=A2 测定-A1 测定,  $\Delta A$  空白管=A2 空白-A1 空白,  $\Delta A=\Delta A$  测定管- $\Delta A$  空白管。(空白管只需做 1-2 次)

## GO 酶活计算

### 1. 按微量石英比色皿计算:

#### (1) 按蛋白浓度计算

酶活定义: 每毫克蛋白每分钟生成 1nmol 乙醛酸苯肼所需的酶量为一个酶活力单位。

GO 酶活 (U/mg prot) =  $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 392.16 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

#### (2) 按样本质量计算

酶活定义: 每克组织每分钟生成 1nmol 乙醛酸苯肼所需的酶量为一个酶活力单位。

GO 酶活 (U/g 质量) =  $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 392.16 \times \Delta A \div W$

#### (3) 按细胞数量计算

酶活定义: 每万细胞每分钟生成 1nmol 乙醛酸苯肼所需的酶量为一个酶活力单位。

GO 酶活 (U/ $10^4$  cell) =  $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times 500 \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.784 \times \Delta A$

$\epsilon$ : 乙醛酸苯肼毫摩尔消光系数: 17000L/mol/cm;  $d$ : 比色皿光径, 1cm;  $V_{\text{反总}}$ : 反应总体积,  $2 \times 10^{-4}$ L;  $V_{\text{样}}$ : 反应中样本体积, 0.01mL;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 1mL;  $C_{\text{pr}}$ : 样本蛋白浓度, mg/mL, 蛋白浓度自行测定;  $W$ : 样本质量, g;  $T$ : 反应时间, 3min; 500: 500 万个细胞;  $10^9$ : 单位换算系数, 1mol= $10^9$ nmol。

### 2. 按 96 孔 UV 板计算:

将上述公式中的  $d=1\text{cm}$  改为  $d=0.6\text{cm}$  (96 孔 UV 板光径) 进行计算即可。

## 注意事项:

1. 测定之前进行预实验, 若吸光值  $A_1 > 1$ , 请将样本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. 色素含量较高的样本, 可在提取酶时加活性炭吸附。
3. 空白管为检测各试剂组分质量的检测孔, 正常情况下, 其 OD 值变化不超过 0.02。

## 实验实例:

1. 称取约 0.1g 三叶草组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 然后 10000g, 4°C, 离心 10min, 取上清进行检测, 使用微量石英比色皿测得  $\Delta A$  测定管=A2 测定-A1 测定=0.8956-0.7839=0.1117,  $\Delta A$  空白管=A2 空白-A1 空白=0.0853-0.077=0.0083,  $\Delta A=\Delta A$  测定管- $\Delta A$  空白管=0.1117-0.0083=0.1034, 按样本质量计算酶活得: GO 酶活 (U/g 质量) =  $392.16 \times \Delta A \div W = 405.4934$  U/g 质量。
2. 称取约 0.1g 菠菜组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 然后 10000g, 4°C, 离心 10min, 取上清稀释 2 倍进行检测, 使用微量石英比色皿测得  $\Delta A$  测定管=A2 测定-A1 测定=0.9286-0.8105=0.1181,  $\Delta A$  空白管=A2 空白-A1 空白=0.0853-0.077=0.0083,  $\Delta A=\Delta A$  测定管- $\Delta A$  空白管=0.1181-0.0083=0.1098, 按样本质量计算酶活得: GO 酶活 (U/g 质量) =  $392.16 \times \Delta A \div W \times 2$  (稀释倍数) = 861.1834 U/g 质量。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com