

## 乙醇酸氧化酶(GO)检测试剂盒(乙醇酸微板法)

### 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。

Leagene 乙醇酸氧化酶(GO)检测试剂盒(乙醇酸微板法)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,通过酶标仪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	TE0531	Storage
试剂(A): GO Lysis Buffer		100T	
试剂(B): 蛋白沉淀剂		4×500ml	4°C 避光
试剂(C): GO 悬浮液		200g	RT
试剂(D): GO Assay Buffer		200ml	RT
试剂(E): GO 启动剂		25ml	4°C 避光
使用说明书		1ml	4°C
			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、96 孔 UV 酶标板、全波长酶标仪

### 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°C 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: 按照下表设置对照孔(备选, 一般可以不设对照孔)、测定孔, 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(μl)	对照孔(备选)	测定孔
GO Assay Buffer	200	200
待测样品	—	20
GO Lysis buffer	20	—
通氮气 30s (备选), 30°C 孵育 10min。		

- 3、GO 测定: 以酶标仪测定 340nm 处吸光度(记为  $A_0$ ), 再加入 GO 启动剂 7μl, 并同时计时, 每隔 30s 测定 1 次 340nm 处吸光度, 共记录 10 次, 以实际测定时间 340nm 处吸光度的记为  $A_1$ 。Leagene 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量, 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有差异进而导致结果偏差。

### 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

$\Delta t$  = 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、如果没有酶标仪，也可以使用紫外分光光度计测定，但应考虑最小检测体积。
- 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、 $\Delta A$  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。
- 7、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 8、试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

**有效期:** 6 个月有效；低温运输，按要求保存。

**相关产品:**

产品编号	产品名称
DM0007	瑞氏-姬姆萨复合染色液
DF0002	AAF 固定液(50%)
DP0051	亚历山大染色液
DP0412	木质素染色液(间苯三酚法)
PT0001	BCA 蛋白定量试剂盒
TC0699	植物总糖和还原糖检测试剂盒(DNS 比色法)
TC2161	脯氨酸(PRO)检测试剂盒(茚三酮微板法)
TO1013	丙二醛(MDA)检测试剂盒(TBA 比色法)
TP1051	叶绿素(Chlorophyll)检测试剂盒(微板法)