

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（ μ L）	130	130
蒸馏水（ μ L）	-	10
样本（ μ L）	10	-
试剂二（ μ L）	40	40
试剂三（ μ L）	20	20



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

充分混匀，立即测定 324nm 处 10s 和 190s 吸光值 A1 和 A2，计算 ΔA 测定管 = A2 测定 - A1 测定， ΔA 空白管 = A2 空白 - A1 空白， $\Delta A = \Delta A$ 测定管 - ΔA 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。

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

(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。

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

(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。

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

ϵ ：乙醛酸苯肼毫摩尔消光系数：17000L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 反总：反应总体积， 2×10^{-4} L；V 样：反应中样本体积，0.01mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；Cpr：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， $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

2. 按 96 孔 UV 板计算：

将上述公式中的 d-1cm 改为 d-0.6cm（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 $A1 > 1$ ，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 ΔA 测定管 = A2 测定 - A1 测定 = $0.8956 - 0.7839 = 0.1117$ ， ΔA 空白管 = A2 空白 - A1 空白 = $0.0853 - 0.077 = 0.0083$ ， $\Delta A = \Delta A$ 测定管 - ΔA 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 ΔA 测定管 = A2 测定 - A1 测定 = $0.9286 - 0.8105 = 0.1181$ ， ΔA 空白管 = A2 空白 - A1 空白 = $0.0853 - 0.077 = 0.0083$ ， $\Delta A = \Delta A$ 测定管 - ΔA 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

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com