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:

编号 / 名称	GCTE0533 50T	Storage
试剂(A): GO Lysis Buffer	2×500ml	4℃ 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℃ 避光
试剂(E): GO 启动剂	4ml	4℃
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：

测定蛋白浓度组织样品 GO(μM/mg・min)=$\Delta A \times V_T/(5.67\times\Delta t\times V_S\times C)$

不测蛋白浓度组织样品 GO(μM/g・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。
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
GCDM0007	瑞氏-姬姆萨复合染色液
GCDF0002	AAF 固定液(50%)
GCDP0051	亚历山大染色液
GCDP0412	木质素染色液(间苯三酚法)
GCPT0001	BCA 蛋白定量试剂盒
GCTC0699	植物总糖和还原糖检测试剂盒(DNS 比色法)
GCTC2161	脯氨酸(PRO)检测试剂盒(茚三酮微板法)
GCTO1013	丙二醛(MDA)检测试剂盒(TBA 比色法)
GCTP1051	叶绿素(Chlorophyll)检测试剂盒(微板法)

