（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K692-S

产品规格：50 Assays(48 samples)/100 Assays(98 samples)

检测仪器：紫外-可见光分光光度计(324 nm)

Elabscience®乙醇酸氧化酶比色法测试盒

Glycolate Oxidase Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测各种植物组织中乙醇酸氧化酶的活力。

检测原理

乙醇酸氧化酶催化乙醇酸钠底物生成乙醛酸，乙醛酸和盐酸苯肼反应生成乙醛酸苯腙，该物质在 324 nm 波长有吸收峰，其光密度值在一定范围内与乙醛酸苯腙浓度呈线性关系，生成的乙醛酸苯腙量反应了乙醇酸氧化酶的活性。

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用考马斯亮蓝法(货号 E-BC-K168-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1(Size 1) (50 assays)	规格 2(Size 2) (100 assays)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extraction Solution)	60 mL×1 瓶	60 mL×2 瓶	2-8°C 保存 12 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 (Buffer Solution)	45 mL×1 瓶	45 mL×2 瓶	2-8°C避光 保存 12 个月
试剂三 (Reagent 3)	显色剂 (Chromogenic Agent)	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	2-8°C避光 保存 12 个月
试剂四 (Reagent 4)	底物 (Substrate)	6 mL×1 瓶	12 mL×1 瓶	2-8°C 保存 12 个月

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：紫外-可见光分光光度计(检测波长 324 nm)，石英比色皿(1 mL 体积，光径 1 cm)。

试剂：双蒸水或去离子水。

试剂准备

① 检测前，将试剂二、试剂三和试剂四平衡至室温；试剂一放置于冰盒待测。

② 工作液配制：

50 Assays：将12 mL纯水加入试剂三中，震荡至溶解均匀；

100 Assays：将24 mL纯水加入试剂三中，震荡至溶解均匀。

未能当天使用完的工作液分装-20℃条件下避光保存，不可反复冻融。

样本准备

① 样本处理

组织样本：取 0.1 g 新鲜植物组织放入匀浆容器中，加入 0.9 mL 预冷的试剂一，4°C 环境匀浆。在 4°C 条件下 12000 × g 离心 10 min，取上清液待测。若离心不完全，可再次离心。若不能当天检测，上清液样本置于-20°C 可保存 2 天。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.3-350 U/mL，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%银杏叶	不稀释	10%酢浆草	不稀释
10%仙人掌	不稀释	10%竹叶	不稀释
10%桂花树叶	4-8	10%樟树叶	3-5

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

① 各试剂与待测样本混合后须立即开始测定。

② 测定时检测体系吸光度大于 1.0 时须稀释样本。

③ 如需使用研钵制备样本组织匀浆，需先将研钵置于 4°C 环境预冷。

操作步骤

① 空白管：取 50 μL 双蒸水加入 5 mL EP 管中。

测定管：取 50 μL 待测样本加入 5 mL EP 管。

② 向步骤①中的各 EP 管中依次加入 650 μL 试剂二、200 μL 工作液和 100 μL 试剂四。

③ 混匀，装入 1 mL 体积，光径 1 cm 石英比色皿中，双蒸水调零，紫外分光光度仪于 324 nm 处，检测 OD 值记为 A_1。

④ 静置 3 min 后，再次检测 OD 值记为 A_2。

操作表

	空白管	**测定管**
双蒸水(μL)	50	--
待测样本(μL)	--	50
试剂二(μL)	650	650
工作液(μL)	200	200
试剂四(μL)	100	100
混匀，装入 1 mL 体积，光径 1 cm 石英比色皿中，双蒸水调零，紫外分光光度仪于 324 nm 处，检测 OD 值记为 A_1。		
静置 3 min 后，再次检测 OD 值记为 A_2。		

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用考马斯亮蓝法(货号 E-BC-K168-M)进行测定。

结果计算

定义：每毫克蛋白在室温下每分钟氧化 1 nmol 乙醇酸所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{乙醇酸氧化酶活性 (U/mgprot)} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d} \div 50 \times 1000 \times f \times 10^3 \div T \div C_{pr}$$

注解:

ΔA：样本的绝对 OD 值变化量，$\Delta A = (A_2 - A_1) - (A_{02} - A_{01})$

A_1：测定管的初始 OD 值

A_2：测定管 3 min 后的 OD 值

A_{01}：空白管的初始 OD 值

A_{02}：空白管 3 min 后的 OD 值

ε：乙醛酸苯腙的毫摩尔消光系数：17 L/(mmol•cm)

d：比色皿光径：1 cm

50：加入反应中的样本体积(50 μL)

1000：反应的总体积(1000 μL)

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

T：反应时间(3 min)

C_{pr}：样本中的蛋白浓度(mgprot/mL)

10^3：单位换算系数(1 μmol = 1000 nmol)

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	0.3-350 U/mL	**平均批间差**	8.2 %
灵敏度	0.3 U/mL	**平均批内差**	1.1 %
平均回收率	102 %		

附录2 实例分析

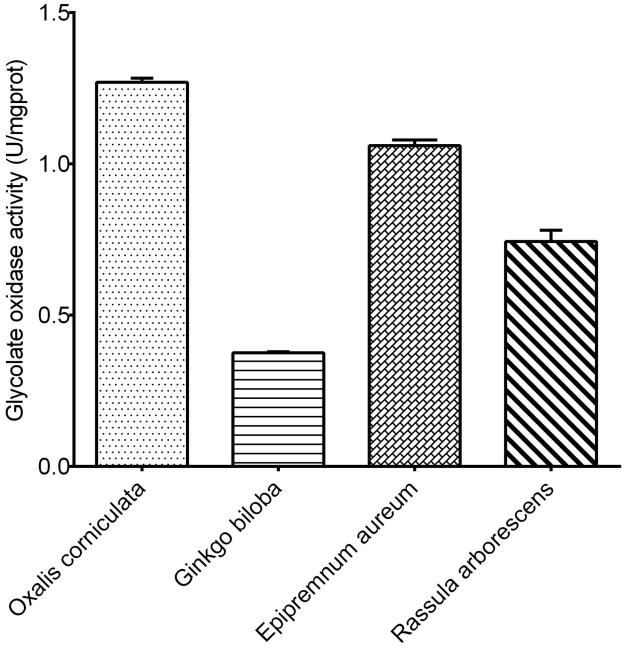
例如检测酢浆草叶片中的乙醇酸氧化酶活性(数据仅供参考):

取50 μL 10%酢浆草叶组织匀浆上清，按说明书操作，测得A_{01}为0.008，A_{02}为0.010，A_1为0.577，A_2为0.608。同时测得样本中蛋白含量为8.93 mgprot/mL。

样本的绝对OD值变化量为：ΔA = (0.608 – 0.577) – (0.010 – 0.008) = 0.029，样本的乙醇酸氧化酶活性计算结果为：

$$\underset{\text{(U/mgprot)}}{\text{乙醇酸氧化酶活性}} = \frac{0.029}{17 \times 1} \div 50 \times 1000 \times 10^3 \div 8.93 \div 3 = 1.27\ \text{U/mgprot}$$

按照说明书，测定酢浆草(10%组织匀浆蛋白含量8.93 mgprot/mL，加样量50 μL)、银杏叶(10%组织匀浆蛋白含量3.04 mgprot/mL，加样量50 μL)、绿萝叶(10%组织匀浆蛋白含量5.39 mgprot/mL，加样量50 μL)和玉树茎(10%组织匀浆蛋白含量5.97 mgprot/mL，加样量50 μL)乙醇酸氧化酶活性(如下图)：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
平行样差异较大	比色皿表面有污染物	彻底清洗比色皿表面
	加入三种试剂前后时间间隔过长	每个测定管应分别依次加入三种试剂并立即混匀后开始测定
ΔA 值很低或小于 0	样本中乙醇酸氧化酶活性过低	增加样本匀浆浓度重新实验
		延长反应时间重新实验
样本颜色较深使初始 OD 值大于 1	样本中含有色物质	使用试剂一稀释样本至初始 OD 值小于 1
		使用适量活性炭对提取液进行脱色

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。