

抗坏血酸氧化酶 (ascorbate oxidase, AAO) 试剂盒说明书

(货号: ADS-F-VC004 紫外法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

抗坏血酸氧化酶 (AAO; EC 1.10.3.3) 是一种含铜的酶, 属“蓝铜氧化酶”家族。也是植物体内的末端氧化酶的一种。其有助于植物对外界环境条件的适应。抗坏血酸氧化酶 (AAO) 直接氧化 AsA, 通过测定 AsA 的氧化量, 可计算该酶活力。

二、试剂盒组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	1. 使用前摇匀; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂一	液体 45mL×1 瓶	4℃ 保存	1. 使用前摇匀; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉体 1 支	4℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 3mL 蒸馏水充分溶解, 一周内使用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

称取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃ 离心 15min, 取上清液置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取

2、检测步骤:

- ① 分光光度计预热 30 min, 调节波长到 265 nm, 蒸馏水调零。
- ② 试剂二在 25℃ 水浴锅中预热 30 min。
- ③ 依次在 1 mL 石英比色皿中加入:

试剂 (μL)	测定管
样本	100
试剂一	850
试剂二	50
迅速混匀, 30s 和 2min30s 时分别在 265nm 读值, 分别记为 A1 和 A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。	

【注】: 1. 若 ΔA 的值在零附近, 可以适当延长反应时间到 5min10s 读取 A2, 改变后的反应时间需代入计算公式重新计算。或适当加大样本量, 则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。

2. 若起始值 A 太大如超过 2 (如颜色较深的植物叶片, 一般色素较高, 则起始值相对会偏高), 可以适当减少样本加样量, 则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。

3. 若下降趋势不稳定，可以每隔 10S 读取一次吸光值，选取一段线性下降的时间段来参与计算，相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按蛋白浓度计算

酶活定义：25℃中每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$AAO(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (Cpr \times V_1) \div T = 92.25 \times \Delta A \div Cpr$$

2、按样本质量计算

酶活定义：25℃中每克样本每分钟氧化 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$AAO(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 92.25 \times \Delta A \div W$$

ϵ ----AsA 在 265nm 处摩尔吸光系数为 $5.42 \times 10^4 \text{ L/mol/cm}$;

d ----比色皿光径 (cm)，1 cm;

$1\text{mol} = 1 \times 10^9 \text{ nmol}$;

Cpr ----上清液蛋白质浓度 (mg/mL)，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒;

W ----样品质量;

V ----提取液体积，1 mL;

V_1 ----加入反应体系中上清液体积 (mL)， $100\mu\text{L} = 0.1 \text{ mL}$;

V_2 ---反应体系总体积 (L)， $1000\mu\text{L} = 1 \times 10^{-3} \text{ L}$;

T ----催化反应时间 (min)，2min。若延长反应时间，则以具体时间代入公式重新计算。