

抗坏血酸氧化酶（ascorbate oxidase, AAO）试剂盒说明书

（货号：ADS-W-VC004 微板法 96 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 100mL×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 18mL×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 1.5mL 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）、96 孔板（UV 板）、离心管、酶标仪、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 酶标仪预热 30 min，温度设为 25℃，设定震荡时间 5s，调节波长到 265 nm。
- ② 试剂二在 25℃水浴锅中预热 30 min。
- ③ 依次在 96 孔板中加入试剂：

试剂（μL）	测定管
样本	20
试剂一	170
试剂二	10
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。

$$AAO(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (Cpr \times V_1) \div T = 184.5 \times \Delta A \div Cpr$$

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。

$$AAO(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 184.5 \times \Delta A \div W$$

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

d ----96 孔板光径 (cm) , 0.5 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) , $20\mu\text{L} = 0.02 \text{ mL}$;

V_2 ---反应体系总体积 (L) , $200\mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$;

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。