

Ascorbate oxidase (AAO) Activity Assay Kit

抗坏血酸氧化酶（AAO）试剂盒说明书

货号:BN72319 | 方法: 微板法 | 规格: 96 样

一、产品简介:

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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	使用前摇匀。
试剂一	液体 18mL×1 瓶	4℃保存	使用前摇匀。
试剂二	粉体×2 支	4℃保存	用前甩几下或 4℃离心使粉体落入试管底部，每支加入 0.5mL 蒸馏水充分溶解（最好一周内使用完）， 用前再稀释 20 倍（1:19）做为试剂二检测。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板（UV 板）、低温离心机、可调式移液器、研钵、冰、蒸馏水。

四、AAO 酶活测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备:

① 组织样本:

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 10min，取上清液置冰上待测。

【注意】若样本颜色较深（如植物叶片），可引起起始值 A1 值较大如超过 2，可在样本制备过程中增加除色素步骤：取约 0.2g 组织（水分充足的样本可取 1g），加入 90%乙醇冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，弃掉色素较深的上清液；以上除色素步骤重复 2 次。最后向离心得到的沉淀中加入 1mL 提取液，混匀或再次冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，在 4℃ 或冰浴进行匀浆(或使用各类常见电动匀浆器)。4℃ 约 12,000rpm 离心 10min，取上清待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量(10^4): 提取液(mL)为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、上机检测:

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， $\Delta A = A1 - A2$ 。

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；
针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算：

1、按蛋白浓度计算

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

$$AAO(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (Cpr \times V1) \div T = 184.5 \times \Delta A \div Cpr$$

2、按样本质量计算

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

$$AAO(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 184.5 \times \Delta A \div W$$

3、按细胞数量计算：

酶活定义：25°C 中每 10^4 个细胞每分钟氧化 1nmol 的 AsA 为 1 个酶活单位。

$$AAO(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 184.5 \times \Delta A \div 500$$

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，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；

500 ---细胞数量，万；

V ---提取液体积，1 mL；

$V1$ ---加入反应体系中上清液体积 (mL)， $20 \mu\text{L} = 0.02 \text{ mL}$ ；

$V2$ ---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。