

Ascorbate oxidase (AAO) Activity Assay Kit

抗坏血酸氧化酶 (AAO) 试剂盒说明书

货号: BN72320 | 方法: 紫外分光法 | 规格: 48 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 60mL×1 瓶	4°C 保存	使用前摇匀。
试剂一	液体 45mL×1 瓶	4°C 保存	使用前摇匀。
试剂二	粉体×2 支	4°C 保存	使用前甩几下或 4°C 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 40 倍 (1:39) 做为试剂二检测。

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、低温离心机、可调式移液器、研钵。

四、抗坏血酸氧化酶 (AAO) 活性测定:

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°C 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°C 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°C 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°C 或冰浴进行匀浆 (或使用各类常见电动匀浆器)。4°C 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 (10⁴): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、上机检测:

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

$$AAO(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T = 92.25 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本质量计算

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

$$AAO(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 92.25 \times \Delta A \div W$$

3、按细胞数量计算：

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

$$AAO(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 92.25 \times \Delta A \div 500$$

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

d ---比色皿光径，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; 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)， $100 \mu\text{L} = 0.1 \text{ mL}$;

$V2$ ---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。