

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

微量法 100T/96S

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

AAO是定位于植物细胞壁的糖蛋白，属“蓝铜氧化酶”家族。细胞壁内的抗坏血酸和AAO与细胞壁的代谢和生长有着密切的联系。AAO 氧化AsA所形成的 MDHA 可通过质膜上的细胞色素b还原，该过程中电子的跨膜运输能够促进细胞生长。

测定原理：

AAO可直接氧化AsA，通过测定AsA的氧化量，可计算得AAO活力。

实验中所需仪器及设备：

低温离心机、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板（UV板）、可调式移液器、研钵、冰、蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体100mL×1瓶，4℃保存。

试剂二：液体20mL×1瓶，4℃保存。

试剂三：粉剂×1瓶，4℃保存。临用前加入2mL蒸馏水充分溶解。

粗酶液提取：

按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL试剂一）进行冰浴匀浆。16000g，4℃离心10min，取上清置冰上待测。

AAO测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热30 min，调节波长到265 nm。
2. 试剂二在25℃水浴锅中预热30 min。
3. 依次在微量石英比色皿/96孔板中加入20μL上清液、170μL预热的试剂二和10μL试剂三，迅速混匀后在265nm测定10s和130s光吸收A1和A2， $\Delta A = A1 - A2$ 。

AAO活性计算公式：

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1). 按蛋白浓度计算

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

$$\begin{aligned} \text{AAO}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= \Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 92.4 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2). 按样本质量计算

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

$$\begin{aligned} \text{AAO}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= \Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 92.4 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

ϵ : AsA在265nm处摩尔吸光系数为 5.42×10^4 L/mol/cm; d: 比色皿光径 (cm), 1 cm; V反总: 反应体系总体积 (L), $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4}$ L; 106: $1 \text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; Cpr: 上清液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定, 建议使用本公司BCA蛋白质含量测定试剂盒; W : 样品质量; V样: 加入反应体系中上清液体积 (mL), $20 \mu\text{L} = 0.02$ mL; V样总: 提取液体积, 1 mL;

T: 催化反应时间 (min), 2min。

b.使用96孔板测定的计算公式如下

(1). 按蛋白浓度计算

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

$$\text{AAO}(\text{nmol}/\text{min} / \text{mg prot}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T$$

$$= 184.8 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2). 按样本质量计算

AAO活性单位定义: 25°C 中每克样本每分钟氧化1nmol AsA 为1个酶活单位。

$$\text{AAO}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 184.8 \times \Delta A \div W$$

ϵ : AsA在265nm处摩尔吸光系数为 5.42×10^4 L/mol/cm; d: 96孔板光径 (cm), 0.5 cm; V反总: 反应体系总体积 (L), $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4}$ L; 106: $1 \text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; Cpr: 上清液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定, 建议使用本公司BCA蛋白质含量测定试剂盒; W : 样品质量; V样: 加入反应体系中上清液体积 (mL), $20 \mu\text{L} = 0.02$ mL; V样总: 提取液体积, 1 mL;

T: 催化反应时间 (min), 2min。

注意事项:

配制好的试剂放在 4°C 保存, 三天内使用完。