

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。

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

(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。

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

ϵ : AsA 在 265nm 处摩尔吸光系数为 $5.42 \times 10^4 \text{ L/mol/cm}$; d : 比色皿光径 (cm), 1 cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积 (L), $200\mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$; 10^6 : $1\text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; C_{pr} : 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; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积 (mL), $20\mu\text{L} = 0.02 \text{ mL}$; $V_{\text{样总}}$: 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。

$$\begin{aligned} \text{AAO}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 184.8 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{AAO}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 184.8 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

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; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积 (L), $200\mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$; 10^6 : $1\text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; C_{pr} : 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; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积 (mL), $20\mu\text{L} = 0.02 \text{ mL}$; $V_{\text{样总}}$: 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。