

## 抗坏血酸氧化酶(AAO)活性检测试剂盒说明书

### Ascorbic Acid Oxidase Activity Assay Kit

分光光度法

货号: AK310

规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK310-A	50 mL×1 瓶	4℃保存;
AK310-B	50 mL×1 瓶	4℃保存;
AK310-C	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加入 5mL 蒸馏水充分溶解;

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 抗坏血酸氧化酶 (ascorbate oxidase, AAO) 是一种含铜的酶, 位于细胞质中或与细胞壁结合。抗坏血酸氧化酶在植物体内的物质代谢中具有重要的作用。它不但与植物的生长发育和抗衰老有关, 而且和果实的储藏有关。抗坏血酸氧化酶催化下, 分子态的氧可将抗坏血酸氧化成去氢抗坏血酸, 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。

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。

自备用品:

紫外分光光度计、1ml 石英比色皿、研钵、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪和蒸馏水。

粗酶液提取:

按照组织质量(g):AK310-A 体积(mL)为 1:5~10 的比例(建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK310-A)进行冰浴匀浆。16000g, 4℃离心 10min, 取上清置冰上待测。

测定步骤

1. 分光光度计预热 30 min, 调节波长到 265 nm, 蒸馏水调零。
2. 将 AK310-B 在 25℃水浴锅中预热 30 min。
3. 在 1ml 石英比色皿中加入

试剂名称	测定管 (μL)
上清液	100
AK310-B	850
AK310-C	50
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:

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。

$$\text{AAO (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\text{Cpr} \times V_{\text{样}} \div T} = 92.4 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{AAO (U/g)} = \frac{\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{(W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T} = 92.4 \times \Delta A \div W$$

注:  $\epsilon$ : AsA 在 265nm 处摩尔吸光系数为  $5.42 \times 10^4$  L/mol/cm; d: 比色皿光径 (cm), 1 cm;  $V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积 (L),  $1000 \mu\text{L} = 1 \times 10^{-3}$  L;  $10^6$ :  $1 \text{ mol} = 1 \times 10^9$  nmol; Cpr: 上清液蛋白

质浓度 (mg/mL) ; V 样: 加入反应体系中上清液体积 (mL) , 100 $\mu$ L=0.1 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; W, 样本质量, g; T: 催化反应时间 (min) , 2min。

**注意事项:**

1. 样品处理等过程均需要在冰上进行;
2. 配制好的试剂放在 4℃保存, 三天内使用完;