

## 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。

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

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。

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

注：  $\epsilon$  : AsA 在 265nm 处摩尔吸光系数为  $5.42 \times 10^4 \text{ L/mol/cm}$ ;  $d$ : 比色皿光径 (cm), 1 cm

;  $V$  反总: 反应体系总体积 (L),  $1000 \mu\text{L} = 1 \times 10^{-3} \text{ L}$ ;  $10^6$ :  $1\text{mol} = 1 \times 10^9 \text{ nmol}$ ;  $C_{\text{pr}}$ : 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) ,  $100\mu\text{L}=0.1\text{ mL}$ ; 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;