

抗坏血酸氧化酶(AAO)活性检测试剂盒说明书

Ascorbic Acid Oxidase Activity Assay Kit

微量法

货号: AK311

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK311-A	100 mL×1 瓶	4℃保存;
AK311-B	20 mL×1 瓶	4℃保存;
AK311-C	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加入 2mL 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/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板)、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): AK311-A 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK311-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/酶标仪预热 30 min, 调节波长到 265 nm, 蒸馏水调零。
2. 将 AK311-B 在 25℃水浴锅中预热 30 min。
3. 在微量石英比色皿/96 孔板中加入

试剂名称	测定管 (μL)
上清液	20
AK311-B	170
AK311-C	10
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。

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

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。

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

注： 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; 10^6 : $1\text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; Cpr: 上清液蛋白质浓度 (mg/mL); 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℃中每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$\text{AAO (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{(\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T} = 184.8 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{AAO (U/g)} = \frac{\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{(W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T} = 184.8 \times \Delta A \div W$$

注： 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; 10^6 : $1\text{mol} = 1 \times 10^9 \text{nmol}$; Cpr: 上清液蛋白质浓度 (mg/mL); 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:

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;