

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°C 保存。

试剂二：液体 20mL×1 瓶，4°C 保存。

试剂三：粉剂×2 瓶，4°C 避光保存。

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°C 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°C 水浴锅中预热 30 min。
3. 取 1 瓶试剂三，加入 1mL 蒸馏水充分溶解；配好的试剂三 3 天内用完。
4. 工作液的配制：将试剂二与试剂三按 170(μL)：10(μL) 的比例混合，用多少配多少。
5. 依次在微量石英比色皿/96 孔板中加入 20μL 上清液、180μL 工作液，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°C 中每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

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

(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。

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

ϵ ：AsA 在 265nm 处摩尔吸光系数为 5.42×10^4 L/mol/cm；d：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 ：1mol = 1×10^6 μmol；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℃中每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

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

(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。

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

ϵ : AsA 在 265nm 处摩尔吸光系数为 $5.42 \times 10^4 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$; d : 96 孔板光径 (cm), 0.5 cm; V 反总: 反应体系总体积 (L), $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$; 10^6 : $1 \text{ mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; 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), $20 \mu\text{L} = 0.02 \text{ mL}$; V 样总: 提取液体积, 1 mL; T: 催化反应时间 (min), 2min。