

抗坏血酸氧化酶检测试剂盒说明书（精简版）

（货号：A122-1-1 Ascorbate Oxidase Kit, AAO 分光光度法 50T/48样）

一、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。

二、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。

三、仪器设备（自备）：

低温离心机、紫外分光光度计、1mL石英比色皿、可调式移液器、研钵、冰、蒸馏水。

四、试剂组成：

试剂一：液体50mL×1瓶，4℃保存。

试剂二：液体60mL×1瓶，4℃保存。

试剂三：粉剂×2瓶，4℃保存，每瓶临用前加入2mL蒸馏水充分溶解。

五、操作步骤：

1、粗酶液提取

(1)、按照组织质量（g）：提取液体积（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。

(2)、试剂二在25℃水浴锅中预热30min。

2、测定操作表：

	空白管	测定管
双蒸水（ μL ）	100	
样本粗酶液（ μL ）		100
试剂二（ μL ）（已预温30min）	850	850
试剂三（ μL ）	50	50
快速混匀，于波长265nm，1mL石英比色皿，双蒸水调零，分别测定10s吸光度值 A_{10} 和130s吸光度值 A_{130} 。（ $\Delta A = A_{10} - A_{130}$ ）。		

六、计算公式：

(1). 按蛋白浓度计算：

活性单位定义：25℃中每毫克蛋白每分钟氧化1nmol AsA为1U。

$$\text{AAO活力} = \frac{(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})}{(\epsilon \times d)} \times V_{\text{反应}} \times 10^9 \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 92.4 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}}$$

(U/mgprot)

(2). 按样本质量计算：

活性单位定义：25℃中每克样本每分钟氧化1nmol AsA为1U。

$$\text{AAO活力} = \frac{(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})}{(\epsilon \times d)} \times V_{\text{反应}} \times 10^9 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 92.4 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W$$

(U/g组织)

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;

$V_{\text{反应}}$: 反应体系总体积 (L)，1000 $\mu\text{L} = 1 \times 10^{-3}$ L;

10^6 : 1mol= 1×10^6 μmol ;

C_{pr} : 上清液蛋白质浓度 (mgprot/mL, prot指蛋白)，需要另外测定，建议使用本公司蛋白质含量测定试剂盒；

$V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积 (mL)，100 $\mu\text{L} = 0.1$ mL;

$V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积，1mL;

W : 样本质量，g;

T : 催化反应时间 (min)，2min。