

## 抗坏血酸氧化酶 (ascorbate oxidase, AAO) 试剂盒说明书 (微板法 96 样)

### 一、产品简介:

抗坏血酸氧化酶 (AAO; EC 1.10.3.3) 是一种含铜的酶, 属“蓝铜氧化酶”家族。也是植物体内的末端氧化酶的一种。其有助于植物对外界环境条件的适应。抗坏血酸氧化酶 (AAO) 直接氧化 AsA, 通过测定 AsA 的氧化量, 可计算该酶活力。

### 二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃ 保存	使用前摇匀
试剂一	液体 18mL×1 瓶	4℃ 保存	使用前摇匀
试剂二	粉体×1 支	4℃ 保存	使用前甩几下或 4℃ 离心使试剂落入试管底部, 再加入 1.5mL 蒸馏水充分溶解, 一周内使用完。

### 三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板 (UV 板)、低温离心机、可调式移液器、研钵、冰、蒸馏水。

### 四、AAO 酶活测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

#### 1、样本制备:

称取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃ 离心 15min, 取上清液置冰上待测。

**【注】:** 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取

#### 2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30 min, 温度设为 25℃, 设定震荡时间 5s, 调节波长到 265 nm。
- ② 试剂二在 25℃ 水浴锅中预热 30 min。
- ③ 依次在 96 孔板中加入试剂:

试剂 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	170
试剂二	10
迅速混匀, 30s 和 2min30s 时分别在 265nm 读值, 分别记为 A1 和 A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。	

**【注】:** 1. 若  $\Delta A$  的值在零附近, 可以适当延长反应时间到 5min10s 读取 A2, 改变后的反应时间需代入计算公式重新计算。或适当加大样本量, 则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。

2. 若起始值 A 太大如超过 2 (如颜色较深的植物叶片, 一般色素较高, 则起始值相对会偏高), 可以适当减少样本加样量, 则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。

3. 若下降趋势不稳定, 可以每隔 10S 读取一次吸光值, 选取一段线性下降的时间段来参与计算, 相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

### 五、结果计算:

#### 1、按蛋白浓度计算

酶活定义: 25℃ 中每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$AAO(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (Cpr \times V1) \div T = 184.5 \times \Delta A \div Cpr$$

## 2、按样本质量计算

酶活定义：25℃中每克样本每分钟氧化 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$\text{AAO}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 184.5 \times \Delta A \div W$$

$\epsilon$ ----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;

$1 \text{ mol} = 1 \times 10^9 \text{ nmol}$ ;

$C_{pr}$ ----上清液蛋白质浓度 (mg/mL), 建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒;

$W$ ----样品质量;

$V$ ----提取液体积, 1 mL;

$V_1$ ----加入反应体系中上清液体积 (mL),  $20 \mu\text{L} = 0.02 \text{ mL}$ ;

$V_2$ ---反应体系总体积 (L),  $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ;

$T$ ----催化反应时间 (min), 2min。若延长反应时间, 则以具体时间代入公式重新计算。