

抗坏血酸氧化酶 (ascorbate oxidase, AAO) 试剂盒说明书 (紫外法 48 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 60mL×1 瓶 | 4℃ 保存 | 使用前摇匀 |
| 试剂一 | 液体 45mL×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 3mL 蒸馏水充分溶解, 一周内使用完。 |

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、低温离心机、可调式移液器、研钵

四、抗坏血酸氧化酶 (AAO) 活性测定:

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 分光光度计预热 30 min, 调节波长到 265 nm, 蒸馏水调零。
- ② 试剂二在 25℃ 水浴锅中预热 30 min。
- ③ 依次在 1 mL 石英比色皿中加入:

| 试剂 (μL) | 测定管 |
|---|-----|
| 样本 | 100 |
| 试剂一 | 850 |
| 试剂二 | 50 |
| 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 ΔA 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。

$$\text{AAO}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T = 92.25 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{AAO}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 92.25 \times \Delta A \div W$$

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;

1mol= 1×10^9 nmol;

Cpr----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;

V1----加入反应体系中上清液体积 (mL), $100\mu\text{L}=0.1$ mL;

V2---反应体系总体积 (L), $1000\mu\text{L}=1 \times 10^{-3}$ 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。