

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0612

Size: 50T/48S

抗坏血酸氧化酶 (AAO) 检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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、需自备的仪器和用品:

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、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加入 5mL 蒸馏水充分溶解

五、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℃离心 10min, 取上清置冰上待测。

六、AAO 测定操作:

1. 分光光度计预热 30 min, 调节波长到 265nm, 蒸馏水调零。
2. 试剂二在 25℃水浴锅中预热 30 min。
3. 依次在 1mL 石英比色皿中加入 100 μL 上清液、850 μL 预热的试剂二和 50 μL 试剂三, 迅速混匀后在 265nm 测定 10s 和 130s 光吸收 A1 和 A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。

七、AAO 活性计算公式:

(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。

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

(2) 按样本质量计算

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

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

ε : AsA 在 265nm 处摩尔吸光系数为 $5.42 \times 10^4 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$; d: 比色皿光径 (cm), 1 cm;
V 反总: 反应体系总体积 (L), $1000 \mu\text{L} = 1 \times 10^{-3} \text{ L}$; 10^6 : $1 \text{ mol} = 1 \times 10^9 \text{ nmol}$; 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; V 样: 加入反应体系中上清液体积 (mL), $100 \mu\text{L} = 0.1 \text{ mL}$; V 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。

八、注意事项:

配制好的试剂放在 4℃保存, 三天内使用完。