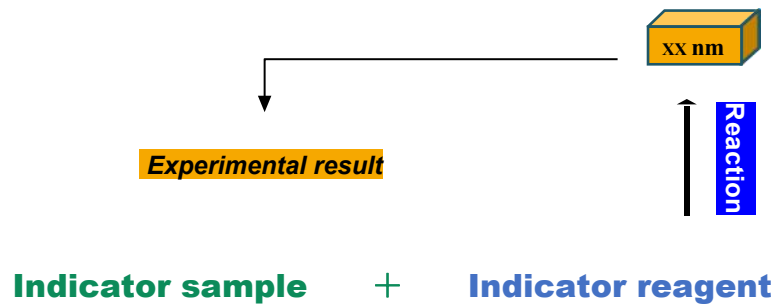


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

抗坏血酸氧化酶（AAO）活性检测试剂盒说明书

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

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。

实验中所需仪器及设备：

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。

试剂组成和配制：

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

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。

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， $\Delta A = A1 - A2$ 。

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。

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

(2). 按样本质量计算

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

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

ϵ ：AsA 在 265nm 处摩尔吸光系数为 $5.42 \times 10^4 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$ ；d：比色皿光径（cm），1 cm； $V_{\text{反总}}$ ：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； $V_{\text{样}}$ ：加入反应体系中上清液体积（mL）， $100 \mu\text{L} = 0.1 \text{ mL}$ ； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL；W，样本质量，g；T：催化反应时间（min），2min。

注意事项:

配制好的试剂放在 4°C 保存, 三天内使用完。