

抗坏血酸氧化酶（AAO）检测试剂盒（分光光度法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

试剂组成和配制：

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℃ 避光保存。

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 测定步骤：

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. 取 1 瓶试剂三，加入 2mL 蒸馏水充分溶解；配好的试剂三 3 天内用完。
4. 工作液的配制：将试剂二与试剂三按 17(mL) :1(mL)的比例混合，用多少配多少。
5. 依次在 1 mL 石英比色皿中加入 100 μ L 上清液和 900 μ L 工作液，迅速混匀后在 265nm 测定 10 s 和 130 s 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。

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

(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。

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

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), $1000\mu\text{L}=1 \times 10^{-3}$

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。