

抗坏血酸氧化酶（ascorbate oxidase, AAO）活性测定

试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

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。

实验中所需仪器及设备：

低温离心机、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板（UV 板）、可调式移液器、研钵、冰、蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 100mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：液体 20mL×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 测定操作:

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min, 调节波长到 265 nm。
2. 试剂二在 25°C 水浴锅中预热 30 min。
3. 取 1 瓶试剂三, 加入 1mL 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 170(μL): 10(μL)的比例混合, 用多少配多少。
5. 依次在微量石英比色皿/96 孔板中加入 20 μL 上清液、180 μL 工作液, 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:
a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下
(1). 按蛋白浓度计算

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

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

$$= 92.4 \times \Delta A \div W$$

ε : AsA 在 265nm 处摩尔吸光系数为 5.42×10^4 L/mol/cm; d: 比色皿光径 (cm), 1 cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积 (L), $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4}$ L; 10^6 : $1\text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; 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; W: 样品质量; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积 (mL), $20 \mu\text{L} = 0.02$ mL; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1 mL; T: 催化反应时间 (min), 2min。

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下
(1). 按蛋白浓度计算

AAO 活性单位定义: 25°C 中每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

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

$$= 184.8 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2). 按样本质量计算

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

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

$$= 184.8 \times \Delta A \div W$$

ε : AsA 在 265nm 处摩尔吸光系数为 5.42×10^4 L/mol/cm; d: 96 孔板光径 (cm), 0.5 cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积 (L), $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4}$ L; 10^6 : $1\text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; 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; W: 样品质量; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积 (mL), $20 \mu\text{L} = 0.02$ mL; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1 mL; T: 催化反应时间 (min), 2min。