

抗坏血酸氧化酶（AAO）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
PYHB8-M48	抗坏血酸氧化酶（AAO）活性检测试剂盒说明书	48T	微量法
PYHB8-M96		96T	

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、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(48T)	试剂装量(96T)	保存条件
提取液	液体 50mL×1 瓶	液体 100mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×1 瓶	2-8℃保存
试剂一的配置：每瓶粉剂加 10ml 蒸馏水，配好的试剂用蒸馏水 100 倍稀释，即按照体积比试剂一（mL）：蒸馏水(mL)=1：99，现用现配。			

四、操作步骤：

样本前处理

植物组织提取液的制备：取一定量植物组织擦净水分及杂质，剪碎后放入研钵，加入液氮，研磨成粉状后转移出来，然后准确称重，按照组织质量（g）：提取液体积(mL) 为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），旋涡混匀抽提 3-5 分钟或者使用组织破碎仪冰浴提取，8000g，4℃离心 10min，取上清液置冰上待测。

测定步骤

1. 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至265nm，蒸馏水调零。
2. 测定前将试剂恢复至常温；
3. 操作表：

	空白管	测定管
样品（μL）	-	20
双蒸水（μL）	20	-

试剂一 (μL)	200	200
记录 265nm 处 20s 时吸光值 A1 和 5min20s 时的吸光值 A2, 计算 $\Delta A = A1_{测定} - A2_{测定}$ 测定。 $\Delta A_{空白} = A1_{空白} - A2_{空白}$; $\Delta A = \Delta A_{测定} - \Delta A_{空白}$ 。(空白管只做 1-2 管)		

五、抗坏血酸氧化酶 (AAO) 活性计算:

(1) 按样本鲜重计算:

单位定义: 中每 g 鲜重样每分钟氧化 1μmol ASA 的量为一个活力单位。

$$AAO (U/g \text{ 质量}) = [\Delta A \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (V_{样} \div V_{样总} \times W) \div T$$

(2) 按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 中每 mg 蛋白每分钟氧化 1μmol ASA 的量为一个活力单位。

$$AAO (U/mg \text{ prot}) = [\Delta A \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (V_{样} \times C_{pr}) \div T$$

V 反总: 反应体系总体积, $0.22 \times 10^{-3} \text{ L}$;

ε: ASA 在 265nm 处的消光系数, $5.42 \times 10^4 \text{ L/mol/cm}$;

d: 比色皿光径, 1cm;

V 样: 加入样本体积, 0.02mL;

V 样总: 加入提取液体积, 1mL;

10^6 : 单位换算系数, $1\text{mol} = 10^6 \mu\text{mol}$;

T: 反应时间, 5min;

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL;

W: 样本质量, g;

六、 注意事项:

实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。