

抗坏血酸氧化酶（ascorbate oxidase, AAO）试剂盒说明书

（货号：G0205W 微板法 96 样）

一、产品简介：

抗坏血酸氧化酶（AAO；EC 1.10.3.3）是一种含铜的酶，属“蓝铜氧化酶”家族。也是植物体内的末端氧化酶的一种。其有助于植物对外界环境条件的适应。抗坏血酸氧化酶（AAO）直接氧化 AsA，通过测定 AsA 的氧化量，可计算该酶活力。

二、试剂盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C 保存	使用前摇匀。
试剂一	液体 18mL×1 瓶	4°C 保存	使用前摇匀。
试剂二	粉体×2 支	4°C 保存	使用前甩几下或 4°C 离心使粉体落入试管底部，每支加入 0.5mL 蒸馏水充分溶解（最好一周内使用完），用前再稀释 20 倍（1:19）做为试剂二检测。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板（UV 板）、低温离心机、可调式移液器、研钵、冰、蒸馏水。

四、AAO 酶活测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：

称取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm，4°C 离心 10min，取上清液置冰上待测。

【注意】若样本颜色较深（如植物叶片），可引起起始值 A1 值较大如超过 2，可在样本制备过程中增加除色素步骤：取约 0.2g 组织（水分充足的样本可取 1g），加入 90%乙醇冰浴匀浆，12000rpm，4°C 离心 10min，弃掉色素较深的上清液；以上除色素步骤重复 2 次。最后向离心得到的沉淀中加入 1mL 提取液，混匀或再次冰浴匀浆，12000rpm，4°C 离心 10min，取上清置冰上待测。

② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，在 4°C 或冰浴进行匀浆(或使用各类常见电动匀浆器)。4°C 约 12,000rpm 离心 10min，取上清待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量(10^4)：提取液(mL)为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30 min，温度设为 25°C，设定震荡时间 5s，调节波长到 265 nm。

② 试剂二在 25°C 水浴锅中预热 30 min。

③ 依次在 96 孔板中加入试剂：

试剂（ μ L）	测定管
样本	20
试剂一	170
试剂二	10

迅速混匀，30s 和 2min30s 时分别在 265nm 读值，分别记为 A1 和 A2， $\Delta A = A1 - A2$ 。

五、结果计算：

1、按蛋白浓度计算

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

$$AAO(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T = 184.5 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本质量计算

酶活定义：25°C中每克样本每分钟氧化 1nmol 的 AsA 为 1 个酶活单位。

$$AAO(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (\text{W} \times V1 \div V) \div T = 184.5 \times \Delta A \div \text{W}$$

3、按细胞数量计算：

酶活定义：25°C中每 10⁴ 个细胞每分钟氧化 1nmol 的 AsA 为 1 个酶活单位。

$$AAO(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 184.5 \times \Delta A \div 500$$

ϵ ---AsA 在 265nm 处摩尔吸光系数为 $5.42 \times 10^4 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$;

d ---96 孔板光径, 0.5 cm; $1 \text{ mol} = 1 \times 10^9 \text{ nmol}$;

Cpr ---上清液蛋白质浓度 (mg/mL), 建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒;

W ---样品质量; 500 ---细胞数量, 万;

V ---提取液体积, 1 mL;

$V1$ ---加入反应体系中上清液体积 (mL), $20 \mu\text{L} = 0.02 \text{ mL}$;

$V2$ ---反应体系总体积 (L), $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$;

T ---催化反应时间 (min), 2min。若延长反应时间, 则以具体时间代入公式重新计算。