

使用说明书

Instruction Manual

抗坏血酸氧化酶(AAO)活性检测试剂盒（微量法）

Ascorbic Acid Oxidase Activity Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

抗坏血酸氧化酶 (ascorbate oxidase, AAO) 是一种含铜的酶，位于细胞质中或与细胞壁结合。抗坏血酸氧化酶在植物体内的物质代谢中具有重要的作用。它不但与植物的生长发育和抗衰老有关,而且和果实的储藏有关。抗坏血酸氧化酶催化下,分子态的氧可将抗坏血酸氧化成去氢抗坏血酸,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。

检测原理

AAO 可直接氧化 AsA, 通过测定 AsA 的氧化量, 可计算得 AAO 活力。

产品组成及储存条件

100T/96S 规格的产品组成如下:

组成	规格	储存条件
CB0030M-A	100mL×1 瓶	4℃保存。
CB0030M-B	20mL×1 瓶	4℃保存。
CB0030M-C	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加入 2mL 蒸馏水充分溶解。

注: 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

操作说明

一、自备用品:

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

二、粗酶液提取:

按照组织质量 (g): CB0030M-A 体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL CB0030M-A) 进行冰浴匀浆。16000g, 4℃离心 10min, 取上清置冰上待测。

三、测定步骤:

- 分光光度计/酶标仪预热 30 min, 调节波长到 265 nm。
- 将 CB0030M-B 在 25℃水浴锅中预热 30 min。
- 在微量石英比色皿/96 孔板中加入:

试剂名称	测定管 (μL)
上清液	100
CB0030M-B	850
CB0030M-C	50
迅速混匀后在 265nm 测定 10s 和 130s 光吸收 A1 和 A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。	

四、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℃中每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

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

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。

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

注： 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 反总：反应体系总体积（L）， $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4}$ L； 10^6 ：1mol = 1×10^6 μmol ；Cpr：上清液蛋白质浓度（mg/mL）；W：样品质量；V 样：加入反应体系中上清液体积（mL）， $20 \mu\text{L} = 0.02$ mL；V 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℃中每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$\text{AAO (nmol/min /mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 184.8 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{AAO (nmol/min/g)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 184.8 \times \Delta A \div W$$

注： 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 反总：反应体系总体积（L）， $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4}$ L； 10^6 ：1mol = 1×10^6 μmol ；Cpr：上清液蛋白质浓度（mg/mL）；W：样品质量；V 样：加入反应体系中上清液体积（mL）， $20 \mu\text{L} = 0.02$ mL；V 样总：提取液体积，1 mL；T：催化反应时间（min），2min。

注意事项

1. 样品处理等过程均需要在冰上进行。
2. 配制好的试剂放在 4℃保存，三天内使用完。
3. 蛋白定量测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
4. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

