北京沃凯生物科技有限公司
全国免费电话:400-819-385
www.bjoka-vip.com
Tel:010-62971590. Fax:62340519
M-ail:postmaster@oka-vip.com

抗坏血酸氧化酶（AAO）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

货号：D17250

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	液体 50 mL×1 瓶	4℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存

溶液的配制：

1、 试剂二：临用前加入 10 mL 蒸馏水充分溶解。

产品说明：

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。

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

注意：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。

需自备的仪器和用品：

低温离心机、紫外分光光度计、1mL 石英比色皿、可调式移液器、研钵/匀浆器、冰、蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

称取约 0.1g 样本，加提取液 1.0mL，冰上充分研磨，11000g 4℃离心 20min，取上清液待测。

二、测定步骤

1、 分光光度计预热 30min，调节波长到 265nm，蒸馏水调零。

2、 试剂一在 25℃水浴锅中预热 30min。

3、 按下表依次在石英比色皿中加入试剂

试剂名称（μL）	空白管	测定管
蒸馏水	100	
上清液		100
试剂一	850	850
试剂二	50	50

迅速混匀后在 265nm 测定 10s 和 130s 光吸收的吸光值，分别为 A1、A2，用 A1 减 A2，得到ΔA 空白管、ΔA 测定管。

三、AAO 活性计算

使用 1mL 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 1μmol AsA 为 1 个酶活单位。

AAO(U/mg prot) =(ΔA 测定管-ΔA 空白管)÷（ε×d）×V 反总×10_6÷(Cpr×V 样)÷T

=0.0923×(ΔA 测定管-ΔA 空白管) ÷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 1μmol AsA 为 1 个酶活单位。

AAO(U/g 质量) =(ΔA 测定管-ΔA 空白管)÷（ε×d）×V 反总×10_6÷(V 样÷V 样总×W)÷T

=0.0923×(ΔA 测定管-ΔA 空白管) ÷W

ε：AsA 在 265nm 处消光系数，$5.42×10_4$ L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 反总：反应体系总体积，1000μL=$1×10_{-3}$L；

10_6：单位换算系数，1mol=$1×10_6$μmol；Cpr：上清液蛋白质浓度（mg/mL），需要另外测定；W：样本质量，g；

V 样：加入反应体系中上清液体积，100μL=0.1mL；V 样总：加入提取液的体积，1 mL；T：催化反应时间，2min。

注意事项：

由于试剂一中含有一定浓度的蛋白（约 1mg/mL），所以在测定样本蛋白浓度时需要减去提取液本身的蛋白含量。

沃凯生物