

抗坏血酸氧化酶 (ascorbate oxidase, AAO) 活性测定试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 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。

实验所需仪器及设备：

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、冰、蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 50mL×1 瓶,4℃ 保存。

试剂二：液体 60mL×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. 分光光度计预热 30 min, 调节波长到 265 nm, 蒸馏水调零。
2. 试剂二在 25℃ 水浴锅中预热 30 min。
3. 取 1 瓶试剂三, 加入 2mL 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 17(mL):1(mL) 的比例混合, 用多少配多少。
5. 依次在 1 mL 石英比色皿中加入 100μL 上清液和 900μL 工作液, 迅速混匀后在 265nm 测定 10 s 和 130 s 光吸收 A1 和 A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。

AAO 活性计算公式：

(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。

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

(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。

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

ϵ : AsA 在 265nm 处摩尔吸光系数为 $5.42 \times 10^4 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$; d : 比色皿光径 (cm), 1 cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积 (L), $1000\mu\text{L} = 1 \times 10^{-3} \text{ L}$; 10^6 : $1\text{mol} = 1 \times 10^9 \text{ nmol}$; 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; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积 (mL), $100\mu\text{L} = 0.1 \text{ mL}$; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; W , 样本质量, g; T : 催化反应时间 (min), 2min。