



抗坏血酸氧化酶(AAO)试剂盒

紫外分光光度法

货号: R43858-48S

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。

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60mL×1瓶	4℃保存	使用前摇匀。
试剂一	液体45mL×1瓶	4℃保存	使用前摇匀。
试剂二	粉体×2支	4℃保存	用前甩几下或4℃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40倍(1:39)做为试剂二检测。

所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL石英比色皿(光径1cm)、低温离心机、可调式移液器、研钵。

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℃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℃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℃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℃或冰浴进行匀浆(或使用各类常见电动匀浆器)。4℃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分光光度计预热30 min, 调节波长到265nm, 蒸馏水调零。

②试剂二在25℃水浴锅中预热30 min。

③依次在1mL石英比色皿中加入:

试剂(μ L)	测定管
样本	100
试剂一	850
试剂二	50
迅速混匀, 30s和2min30s时分别在265nm读值, 分别记为A1和A2, $\Delta A=A1-A2$ 。	

【注】: 1.若 ΔA 小于0.01,可适当延长反应时间T (如延长至到7min30s后读取A2); 或适当增加样本加样量V1 (如增至200 μ L, 则试剂一相应减少);或增加样本量W。则改变后的T 和 V1 和 W 需代入计算公式重新计算。

2. 若起始值A 太大如超过2(如颜色较深的植物叶片, 一般色素较高, 则起始值相对会偏高),可以适当减少样本加样量, 则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。

3. 若下降趋势不稳定, 可以每隔10S 读取一次吸光值, 选取一段线性下降的时间段来参与计算, 相对应的A 值也代入计算公式重新计算。



结果计算:

1、按蛋白浓度计算

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

$$\begin{aligned}\text{AAO}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_1) \div T \\ &= 92.25 \times \Delta A \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

2、按样本质量计算

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

$$\begin{aligned}\text{AAO}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T \\ &= 92.25 \times \Delta A \div W\end{aligned}$$

3、按细胞数量计算:

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

$$\begin{aligned}\text{AAO}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T \\ &= 92.25 \times \Delta A \div 500\end{aligned}$$

E--AsA 在265nm 处摩尔吸光系数为5.42×10⁴L/mol/cm;

d---比色皿光径, 1cm;

1mol=1×10⁹nmol;

Cp--- 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, 1mL;

V1---加入反应体系中上清液体积(mL), 100μL=0.1 mL;

V2--- 反应体系总体积 (L), 1000μL=1×10⁻³L;

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。