



抗坏血酸氧化酶 (AAO) 活性检测试剂盒
Ascorbate Oxidase (AAO) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



抗坏血酸氧化酶 (AAO) 活性检测试剂盒

Ascorbate Oxidase (AAO) Activity Assay Kit

一、产品描述

抗坏血酸氧化酶 (AAO) 是一种定位于植物细胞质或细胞壁中的多铜氧化酶，与其它氧化还原反应相偶联起到末端氧化酶的作用，能够将抗坏血酸氧化为单脱氢抗坏血酸 (Monodehydroascorbate)，从而调控植物体外抗坏血酸库的氧化还原状态，可调控植物的逆境响应、基因表达和生长发育等，与植物的生长发育和抗衰老密切相关，在植物生理和代谢过程中具有重要的作用。

抗坏血酸氧化酶可催化抗坏血酸氧化生成脱氧抗坏血酸，抗坏血酸在 265 nm 处具有特征吸收峰，通过测定其氧化速率即可表征抗坏血酸氧化酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 110 mL×1 瓶	4°C避光保存	-
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂二	粉剂×2 瓶	4°C避光保存	使用前加入 10 mL 蒸馏水充分溶解 (配置后 4°C可保存 2 天)

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿（光径 10 mm）/96 孔 UV 板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴和蒸馏水。

1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

按照组织质量 (g)：提取液体积 (mL) 为 1：(5-10) 的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4°C 12000 g 离心 20 min，取上清即为粗酶液，置于冰上待测。

2.测定步骤

①紫外分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 265 nm，蒸馏水调零。

②试验前将试剂一 25°C 预热 30 min。

③在 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	空白组 (μL)
粗酶液	20	-
蒸馏水	-	20
试剂一	170	170
试剂二	10	10

吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定 10 s（总时间）时 265 nm 处吸光值，记为 A1 测定和 A1 空白；②准确反应 120 s 后，测定 130 s（总时间）时 265 nm 处吸光值，记为 A2 测定和 A2 空白；③计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}}$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}}$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}$ 。注：空白组只需测定 1-2 次。

3. 抗坏血酸氧化酶（AAO）活性计算

3.1 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：25°C 条件下每 mg 组织蛋白每分钟氧化 1 μmol 抗坏血酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{AAO (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^6}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} = \frac{0.1845 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：25°C 条件下每 g 组织每分钟氧化 1 μmol 抗坏血酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{AAO (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^6}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times W \times T} = \frac{0.1845 \times \Delta A}{W}$$

注释： V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，20 $\mu\text{L} = 0.02 \text{ mL}$ ； V 样总：粗酶液总体积，1 mL；

V 反总：反应体系总体积，200 $\mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ； ϵ ：抗坏血酸摩尔吸光系数， $5.42 \times 10^4 \text{ L/mol/cm}$ ； d_1 ：96

孔 UV 板光径，0.5 cm； Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL； W：样品质量，g； T：反应时间，2 min； 10^6 ：

单位换算系数，1 mol = $1 \times 10^6 \mu\text{mol}$ 。

3.2 使用微量石英比色皿测定的计算公式

①按组织蛋白浓度计算

单位定义:25°C条件下每 mg 组织蛋白每分钟氧化 1 μmol 抗坏血酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{AAO (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^6}{\epsilon \times d_2 \times V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} = \frac{0.0923 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义: 25°C条件下每 g 组织每分钟氧化 1 μmol 抗坏血酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{AAO (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^6}{\epsilon \times d_2 \times V_{\text{样}} \times W \times T} = \frac{0.0923 \times \Delta A}{W}$$

注释: V 样: 反应体系中加入粗酶液的体积, 20 μL=0.02 mL; V 样总: 粗酶液总体积, 1 mL;

V 反总: 反应体系总体积, 200 μL=2×10⁻⁴ L; ε: 抗坏血酸摩尔吸光系数, 5.42×10⁴ L/mol/cm; d₂: 微量石英比色皿光径, 1 cm; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样品质量, g; T: 反应时间, 2 min; 10⁶: 单位换算系数, 1 mol=1×10⁶ μmol。

四、注意事项

- ①试剂二配置后有效期较短, 为便于试验安排, 附赠一瓶作为备用, 每瓶均可满足至少 100 个样本的测定;
- ②准确在 10 s 和 130 s 处完成读数, 以确保实验结果的准确性和重复性; 若使用 96 孔 UV 板应使用多道移液器且分批进行检测, 以确保组间反应时间一致;
- ③提取液中含有约 1 mg/mL 蛋白, 测定样品蛋白浓度时需减去提取液本身的蛋白含量;
- ④若测定样本较多可根据使用量按试剂一: 试剂二=17:1 的体积比配置为 AAO 工作液 (现用现配), 依次加入 20 μL 粗酶液和 180 μL AAO 工作液充分混匀后进行后续操作;
- ⑤为保证结果准确且避免试剂损失, 测定前请仔细阅读说明书 (以实际收到说明书内容为准), 确认试剂储存和准备是否充分, 操作步骤是否清楚, 且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定, 过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

