

## 抗坏血酸氧化酶（AAO）活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1180

产品规格：100管/96样

### 产品简介：

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。

### 产品内容：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体110mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体20mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1瓶	2-8℃

溶液的配制：

1. 试剂二：临用前加入10mL蒸馏水充分溶解。

### 需自备的仪器和用品：

低温离心机、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板（UV板）、可调式移液器、研钵/匀浆器、冰、蒸馏水。

### 操作步骤：

#### 一、样品处理

称取约0.1g样本，加提取液1mL，冰上充分研磨，11000g 4℃离心20min，取上清液待测。

#### 二、测定操作

1. 分光光度计/酶标仪预热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. 按下表依次在微量石英比色皿/96孔板中加入试剂。

试剂名称（ $\mu$ L）	空白管	测定管
蒸馏水	20	-
上清液	-	20
试剂一	170	170
试剂二	10	10

迅速混匀后在265nm测定10s和130s的吸光值，分别为A1、A2，用A1减A2，得到 $\Delta A$ 空白管、 $\Delta A$ 测定管。

#### 三、AAO活性计算

##### 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



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

AAO活性单位定义：25℃中每毫克蛋白每分钟氧化1 $\mu\text{mol}$  AsA为1个酶活单位。

$$\text{AAO(U/mg prot)} = (\Delta\text{A测定管} - \Delta\text{A空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^6 \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ = 0.0923 \times (\Delta\text{A测定管} - \Delta\text{A空白管}) \div \text{Cpr}$$

(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1 $\mu\text{mol}$  AsA为1个酶活单位。

$$\text{AAO(U/g 质量)} = (\Delta\text{A测定管} - \Delta\text{A空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^6 \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ = 0.0923 \times (\Delta\text{A测定管} - \Delta\text{A空白管}) \div W$$

$\epsilon$ : AsA在265nm处消光系数,  $5.42 \times 10^4 \text{L/mol/cm}$ ;  $d$ : 比色皿光径, 1cm;  $V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积,  $200\mu\text{L} = 2 \times 10^{-4}\text{L}$ ;  $10^6$ : 单位换算系数,  $1\text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$ ;  $\text{Cpr}$ : 上清液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定;  $W$ : 样本质量, g;  $V_{\text{样}}$ : 加入反应体系中上清液体积,  $20\mu\text{L} = 0.02\text{mL}$ ;  $V_{\text{样总}}$ : 提取液体积, 1mL;  $T$ : 催化反应时间, 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1 $\mu\text{mol}$  AsA为1个酶活单位。

$$\text{AAO(U/mg prot)} = (\Delta\text{A测定管} - \Delta\text{A空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^6 \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ = 0.1538 \times (\Delta\text{A测定管} - \Delta\text{A空白管}) \div \text{Cpr}$$

(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1 $\mu\text{mol}$  AsA为1个酶活单位。

$$\text{AAO(U/g 质量)} = (\Delta\text{A测定管} - \Delta\text{A空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^6 \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ = 0.1538 \times (\Delta\text{A测定管} - \Delta\text{A空白管}) \div W$$

$\epsilon$ : AsA在265nm处消光系数,  $5.42 \times 10^4 \text{L/mol/cm}$ ;  $d$ : 96孔板光径, 0.6cm;  $V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积,  $200\mu\text{L} = 2 \times 10^{-4}\text{L}$ ;  $10^6$ : 单位换算系数,  $1\text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$ ;  $\text{Cpr}$ : 上清液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定;  $W$ : 样本质量, g;  $V_{\text{样}}$ : 加入反应体系中上清液体积,  $20\mu\text{L} = 0.02\text{mL}$ ;  $V_{\text{样总}}$ : 提取液体积, 1mL;  $T$ : 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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com