

抗坏血酸氧化酶（AAO）检测试剂盒（分光法）

货号：PMK1033BKS

保存：4℃避光保存 12 个月

规格：25 管/24S 50 管/48S

适用样本：植物组织

产品简介

抗坏血酸氧化酶（AAO）是一种主要定位于植物细胞质或细胞壁中的多铜氧化酶，属“蓝铜氧化酶”家族，与其它氧化还原反应相偶联起到末端氧化酶的作用。AAO 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。本试剂盒提供了一种简单的检测方法检测植物样本中 AAO 的活性水平。其原理是 AAO 可催化抗坏血酸氧化生成脱氧抗坏血酸，抗坏血酸在 265nm 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。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	25 管	50 管	
试剂一	30mL	60mL	4℃ 保存
试剂二	55mL	110mL	4℃ 保存
试剂三	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	4℃ 避光保存

自备耗材

紫外分光光度计（能测 265nm 处的吸光度）及水浴锅
石英比色皿、可调节式移液枪及枪头
制冰机、低温离心机
研钵/匀浆器/研磨仪/均质机/超声波破碎仪等能破碎植物细胞壁的设备
去离子水

试剂准备

试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；保存于 4℃。

试剂二：即用型；使用前，平衡到室温；保存于 4℃。

试剂三：临用前每瓶加入 6mL 去离子水充分溶解。现用现配。配制好的试剂三 4℃ 保存，并且 3 天内用完。

样本制备

植物组织：称取 0.1g，加入 1mL 预冷的试剂一，将样本冰上进行匀浆或研磨或超声破碎。13,000g，4℃ 离心 20min，取上清液置冰上待测。

注意：建议使用新鲜样本。如果不立即使用，可将样品在-80℃下保存一个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 紫外分光光度计预热 30min 以上，将波长到 265nm，去离子水调零。
2. 试剂二在 25℃ 水浴锅中预热 30min。
3. 样本测定：在石英比色皿中依次加入下列试剂：

试剂名称	测定管 (μL)	空白管 (μL)
样本上清液	200	0
去离子水	0	200
试剂二	1700	1700
试剂三	100	100

迅速混匀后在 265nm 测定 10s (总时间) 和准确反应 120s 后, 130s (总时间) 时吸光值 A_1 和 A_2 。计算 $\Delta A_{\text{测}} = A_{1\text{测}} - A_{2\text{测}}$, $\Delta A_{\text{空}} = A_{1\text{空}} - A_{2\text{空}}$, $\Delta A = \Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}}$ 。空白管只需测定 1-2 次。

该反应体系是按照常规的容量 3mL 左右的比色皿设计的, 如果比色皿最适合的加样体积不是 2mL 左右, 可以根据实际需要的体积按比例调整

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。如果初始值过高, 超出仪器检测范围, 可能是仪器校准不当或样本中有干扰物质, 确认仪器使用无误后可用试剂一适当稀释样本, 计算结果乘以稀释倍数; 如果初始值很低, 基本没有下降的空间, 可能是仪器校准不当或 AAO 活性太高、反应太快导致的, 确认仪器使用无误后可用试剂一进一步稀释, 计算结果乘以稀释倍数; 如果初始值正常, ΔA 小于 0.001, 可增加样本量进行检测。

结果计算

1. 按照样本质量计算

活性单位定义: 每 g 组织在反应体系中每分钟氧化 1nmol AsA 为 1 个酶活单位 U。

$$AAO(U/g \text{ 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 92.25 \times \Delta A \div W$$

2. 按样本蛋白浓度计算

活性单位定义: 每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟氧化 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$AAO(U/mg \text{ prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T = 92.25 \times \Delta A \div Cpr$$

$V_{\text{反应}}$: 反应体系总体积 (L), $2000 \mu L = 1 \times 10^{-3} L$; ϵ : AsA 在 265nm 处摩尔吸光系数为 $5.42 \times 10^4 L/mol/cm$; d : 比色皿光径 (cm), 1 cm; 10^9 : $1mol = 1 \times 10^9 nmol$; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积 (mL), $200 \mu L = 0.2mL$; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; W , 样本质量, g; Cpr : 样本蛋白质浓度, mg/mL; T : 催化反应时间 (min), 2min。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验, 尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究, 如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途, 我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用, 并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用; 否则, 可能导致结果异常。
5. 勤换吸头, 避免各组分之间的交叉污染。

相关产品:

PMK1030BKM 还原型抗坏血酸 (AsA) / 维生素 C 检测试剂盒 (微量法)

PMK1034BKM 抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 检测试剂盒 (微量法)

更多产品详情了解, 请关注公众号:

