

CheKine™ 抗坏血酸氧化酶 (AAO) 活性检测试剂盒 (微量法)

Cat #: KTB3093

Size: 48 T/48 S 96 T/96 S

	抗坏血酸氧化酶 (AAO) 活性检测试剂盒 (微量法)		
REF	货号: KTB3093	LOT	批号: 见产品标签
	适用样本: 植物组织		
	保质期: 4°C, 避光保存 6 个月		

原理

抗坏血酸氧化酶 (Ascorbic Acid Oxidase, 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。CheKine™ 抗坏血酸氧化酶 (AAO) 活性检测试剂盒 (微量法) 提供了一种简单的检测方法, 用于检测生物样本, 如植物组织中 AAO 的活性。AAO 可直接氧化 AsA, 通过测定 AsA 的氧化量, 可计算得 AAO 活力。

包装清单

试剂盒组分	规格		储存条件
	48 T	96 T	
Extraction Buffer	60 mL	120 mL	4°C
Reagent I	11 mL	22 mL	4°C
Reagent II	Powder×1 vial	Powder×2 vials	4°C, 避光保存

注意: 正式检测前, 建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。

自备耗材

- 酶标仪或紫外分光光度计 (能测 265 nm 处的吸光度)
- 恒温箱、低温离心机
- 96 孔 UV 板或微量石英比色皿、可调节式移液枪及枪头
- 去离子水
- 匀浆器 (如果是组织样本)

试剂准备

Extraction Buffer: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4°C 保存。

Reagent I : 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4°C 保存。

Working Reagent II : 临用前配制, 每瓶加入 5 mL 去离子水充分溶解待用, 配好的试剂 3 天内用完。4°C 避光保存。

样本制备

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。

1. 植物组织：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL Extraction Buffer 捣碎，冰浴超声波破碎 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），16,000 g，4℃离心 20 min，取上清液，置冰上待测。

注意：如需测定蛋白浓度，推荐使用 Abbkine 货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）进行样本蛋白质浓度测定。因 Extraction Buffer 中含有一定浓度的蛋白（约 1 mg/mL），所以在测定样本蛋白浓度时需要减去 Extraction Buffer 本身的蛋白含量。

实验步骤

1. 酶标仪或紫外分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 265 nm，紫外分光光度计用去离子水调零。

2. Reagent I 置于 25℃孵育 30 min。

3. 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中，测定管加入 20 μL 样本，170 μL Reagent I，10 μL Working Reagent II，迅速混匀。

4. 用酶标仪在 265 nm 下测定 10 s 时的吸光值 A₁ 和 2 min 10 s 后的吸光值 A₂，计算ΔA=A₁-A₂。

注意：（1）实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。（2）因是根据反应速率计算酶活，为保证每个样本的反应时间尽量一致，不推荐同时检测过多样本。（3）如果ΔA_测小于 0.001 可适当加大样本量。如果ΔA_测大于 1，样本可用 Extraction Buffer 进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量。

结果计算

注意：我们为您提供的计算公式，包括推导过程计算公式和简洁计算公式。两者完全相等。建议以加粗的简洁计算公式为最终计算公式。

A. 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式如下

1. 组织中 AAO 活力的计算：

（1）按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：25℃中每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟氧化 1 nmol 的 AsA 定义为一个酶活力单位。

AAO (U/mg prot)=[ΔA×V_{反总}÷(ε×d)×10⁹]÷(Cpr×V_样)÷T=184.5×ΔA÷Cpr

（2）按样本鲜重计算：

单位的定义：25℃中每 g 组织在反应体系中每分钟氧化 1 nmol 的 AsA 定义为一个酶活力单位。

AAO (U/g 鲜重)=[ΔA×V_{反总}÷(ε×d)×10⁹]÷(V_样÷V_{样总}×W)÷T=184.5×ΔA÷W

V_{反总}：反应体系总体积，2×10⁻⁴ L；ε：AsA 在 265 nm 处摩尔消光系数，5.42×10⁴ L/mol/cm；d：96 孔 UV 板光径，0.5 cm；10⁹：1 mol=1×10⁹ nmol；V_样：加入样本体积，0.02 mL；V_{样总}：加入 Extraction Buffer 体积，1 mL；T：反应时间，2 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样品质量，g。

B. 使用微量石英比色皿测定的计算公式

将上述计算公式中光径 d: 0.5 cm 调整为 d: 1 cm 进行计算即可。

相关产品

Catalog No.	Product Name
KTB3090	CheKine™ 脱氢抗坏血酸（DHA）含量检测试剂盒（微量法）
KTB3091	CheKine™ 抗坏血酸过氧化物酶（APX）活性检测试剂盒（微量法）

免责声明

本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

