

抗坏血酸氧化酶（AAO）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

货号：BC1260

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 50 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	2-8℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 10 mL 蒸馏水充分溶解。

产品说明：

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。

需自备的仪器和用品：

低温离心机、紫外分光光度计、1mL石英比色皿、可调式移液器、研钵/匀浆器、冰、蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

称取约 0.1g 样本，加提取液 1.0mL，冰上充分研磨，11000g 4℃离心 20min，取上清液待测。

二、测定步骤

- 1、分光光度计预热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1mL石英比色皿中加入试剂

试剂名称（μL）	空白管	测定管
蒸馏水	100	
上清液		100
试剂一	850	850
试剂二	50	50

迅速混匀后在 265nm 测定 10s 和 130s 光吸收的吸光值，分别为 A1、A2，用 A1 减 A2，得到 ΔA 空白管、ΔA 测定管。

三、AAO 活性计算





使用1mL石英比色皿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1μmol AsA为1个酶活单位。

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

(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1μmol AsA为1个酶活单位。

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

ϵ : AsA在265nm处消光系数, $5.42 \times 10^4 \text{ L/mol/cm}$; d : 1mL石英比色皿光径, 1cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $1000\mu\text{L} = 1 \times 10^{-3} \text{ L}$; 10^6 : 单位换算系数, $1\text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; C_{pr} : 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, $100\mu\text{L} = 0.1\text{mL}$; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液的体积, 1 mL; T : 催化反应时间, 2min。

注意事项:

由于提取液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。

相关发表文献:

[1] Meng X, Luo S, Dawuda MM, Gao X, Wang S, Xie J, Tang Z, Liu Z, Wu Y, Jin L, Lyu J, Yu J. Exogenous silicon enhances the systemic defense of cucumber leaves and roots against CA-induced autotoxicity stress by regulating the ascorbate-glutathione cycle and photosystem II. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2021 Dec 20;227:112879. doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112879. Epub 2021 Oct 11. PMID: 34649142.

[2] Xu J, Wei Z, Lu X, Liu Y, Yu W, Li C. Involvement of Nitric Oxide and Melatonin Enhances Cadmium Resistance of Tomato Seedlings through Regulation of the Ascorbate-Glutathione Cycle and ROS Metabolism. *Int J Mol Sci.* 2023 May 31;24(11):9526. doi: 10.3390/ijms24119526. PMID: 37298477; PMCID: PMC10253633.

[3] Bai Z, Ding X, Zhang R, Yang Y, Wei B, Yang S, Gai J. Transcriptome Analysis Reveals the Genes Related to Pollen Abortion in a Cytoplasmic Male-Sterile Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Int J Mol Sci.* 2022 Oct 13;23(20):12227. doi: 10.3390/ijms232012227. PMID: 36293079; PMCID: PMC9603564.

[4] Zhu M, Wang X, Zhou Y, Tan J, Zhou Y, Gao F. Small RNA Sequencing Revealed that miR4415, a Legume-Specific miRNA, was Involved in the Cold Acclimation of *Ammopiptanthus nanus* by Targeting an L-Ascorbate Oxidase Gene and Regulating the Redox State of Apoplast. *Front Genet.* 2022 Apr 4;13:870446. doi: 10.3389/fgene.2022.870446. PMID: 35444684; PMCID: PMC9013972.

[5] Wang F, Lu T, Zhu L, Cao A, Xie S, Chen X, Shen H, Xie Q, Li R, Zhu J, Jin X, Li H. Multicopper oxidases GbAO and GbSKS are involved in the *Verticillium dahliae* resistance in *Gossypium barbadense*. *J Plant Physiol.* 2023 Jan;280:153887. doi: 10.1016/j.jplph.2022.153887. Epub 2022 Dec 15. PMID: 36543064.

相关系列产品:

BC1230/BC1235 抗坏血酸 (AsA) 含量检测试剂盒

BC1240/BC1245 脱氢抗坏血酸 (DHA) 含量检测试剂盒

BC0650/BC0655 单脱氢抗坏血酸还原酶 (MDHAR) 活性检测试剂盒

