

抗坏血酸过氧化物酶 (Ascorbate peroxidase, APX) 试剂盒说明书

(货号: G0203F 紫外法 48 样)

一、产品简介:

抗坏血酸过氧化物酶 (APX; EC 1.11.1.11) 也称维生素 C 过氧化物酶, 是植物细胞中防御外界氧化胁迫和植物本身活性氧代谢的重要抗氧化酶类, 在降低 H_2O_2 对植物细胞产生氧化损伤方面起关键作用。

抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 首先与 H_2O_2 形成中间复合物, 中间复合物接着氧化 AsA, 因此 APX 与 AsA 具有一定的负相关性, 通过测定 AsA 氧化速率, 来计算 APX 酶活性。

二、测试盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4°C 保存	用前甩几下或 4°C 离心使试剂落入试管底部, 再加 6 mL 蒸馏水充分溶解, 用不完的试剂分装后 -20°C 保存 (可保存一个月), 禁止反复冻融, 解冻后可 4°C 保存并一周内使用完。
试剂三	液体 6mL×1 瓶	4°C 保存	

三、所需仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、低温离心机、移液枪、研钵、冰和蒸馏水。

四、抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4°C 离心 20min, 取上清置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取

2、上机检测:

- ① 紫外分光光度计预热 30 min, 调节波长到 290nm, 用蒸馏水调零。
- ② 试剂一放 25°C 水浴中预热 30min (如果实验室温度达到 25°C 以上, 可以静置 30min)
- ③ 依次在 1mL 石英比色皿中加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	60
试剂一	740
试剂二	100
试剂三	100
迅速混匀, 在 290nm 测定 30 s 和 5min30 s 分别读值 A, 相应记为 A1 和 A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。	

【注】1. 若 ΔA 的值在零附近, 可适当延长反应时间到 10min30s 读取 A2, 改变后的反应时间需代入计算公式重新计算。或适当加大样本量, 则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。

2. 若起始值 A 太大如超过 2 (如颜色较深的植物叶片, 一般色素较高, 则起始值相对会偏高), 可以适当减少样本加样量, 则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。

3. 若下降趋势不稳定，可以每隔 10S 读取一次吸光值，选取一段线性下降的时间段来参与计算，相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按蛋白浓度计算：

酶活定义：25℃条件下，每毫克蛋白每分钟氧化 1μmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$APX(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^6 \div (C_{pr} \times V_1) \div T = 1.19 \times \Delta A \div C_{pr}$$

2、按质量计算：

酶活定义：25℃条件下，每克组织每分钟氧化 1μmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$APX(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^6 \div (W \times V_1 \div V) \div T = 1.19 \times \Delta A \div W$$

ε---AsA 在 290nm 处摩尔吸光系数为 $2.8 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；

d---比色皿光径（cm），1 cm；

10^6 ---1mol= $1 \times 10^6 \mu\text{mol}$ ；

W---样本质量，g；

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入反应体系中上清液体积（mL），60μL=0.06mL；

V2---反应体系总体积（L），1000μL= $1 \times 10^{-3} \text{ L}$ ；

T---催化反应时间（min），5min，

Cpr---上清液蛋白质浓度（mg/mL），建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。