

抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 活性测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

APX 是植物清除活性氧的重要抗氧化酶之一，也是抗坏血酸代谢的关键酶之一。APX 具有多种同功酶，分别定位于叶绿体、胞质、线粒体、过氧化物和乙醛酸体，以及过氧化物体和类囊体膜上。APX 催化 H_2O_2 氧化 AsA，是植 AsA 的主要消耗者。APX 的活性直接影响到 AsA 的含量，APX 与 AsA 具有一定的负相关性。

测定原理：

APX 催化 H_2O_2 氧化 AsA，通过测定 AsA 氧化速率，来计算得 APX 活性。

自备仪器用品：

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)、移液枪、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 120mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加 3 mL 蒸馏水充分溶解。

试剂三：液体 3mL×1 支，4℃ 保存。

粗酶液提取：

按照组织质量 (g)：试剂一体积 (mL) 为 1：5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一) 进行冰浴匀浆。13000g，4℃ 离心 20min，取上清置冰上待测。

测定：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上，调节波长到 290nm，用蒸馏水调零。
2. 试剂一在 25℃ 中预热 30min。
3. 依次在微量石英比色皿/96 孔板中加入 20μL 上清液、140μL 预热的试剂一 20μL 试剂二和 20μL 试剂三，迅速混匀后在 290nm 测定 10s 和 130s 光吸收 A1 和 A2， $\Delta A=A1-A2$ 。

APX 活性计算：

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算

活性单位定义：每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{APX}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 1786 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：每 g 组织每分钟氧化 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{APX}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 1786 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

ϵ ：AsA 在 290nm 处摩尔吸光系数为 $2.8 \times 10^3 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$ ； d ：比色皿光径 (cm)，1 cm； $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积 (L)， $200\mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ； 10^9 ： $1\text{mol} = 1 \times 10^9 \text{ nmol}$ ； Cpr ：上清液蛋白质浓度 (mg/mL)，需要另外测定，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒； W ：样品质量； $V_{\text{样}}$ ：加入反应体系中上清液体积 (mL)， $20\mu\text{L} = 0.02\text{mL}$ ； $V_{\text{样总}}$ ：提取液体积，1 mL； T ：催化反应时间 (min)，2min。

b.使用 96 孔板测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算

活性单位定义：每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{APX}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 3571 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：每 g 组织每分钟氧化 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{APX}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 3571 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

ϵ : AsA 在 290nm 处摩尔吸光系数为 $2.8 \times 10^3 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$; d : 96 孔板光径 (cm), 0.5 cm; V 反总: 反应体系总体积 (L), $200\mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$; 10^9 : $1\text{mol} = 1 \times 10^9 \text{ nmol}$; Cpr : 上清液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定, 建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒; W : 样品质量; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积 (mL), $20\mu\text{L} = 0.02\text{mL}$; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1 mL; T : 催化反应时间 (min), 2min。

注意事项:

配制好的试剂二 4℃ 保存, 并且 3 天内使用完。