

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具有多种同工酶，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H₂O₂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H₂O₂氧化AsA，通过测定AsA氧化速率，来计算得APX活性。

自备仪器和用品：

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。

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

$$=1786 \times \Delta A \div W$$

ϵ : AsA在290nm处摩尔吸光系数为 2.8×10^3 L/mol/cm; d: 比色皿光径 (cm), 1 cm; V反总: 反应体系总体积

(L), $200\mu\text{L}=2 \times 10^{-4}$ L; 10^9 : $1\text{mol}=1 \times 10^9$ 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样: 加入反应体系中上清液体积 (mL), $20\mu\text{L}=0.02$ mL; V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 2.8×10^3 L/mol/cm; d: 96孔板光径 (cm), 0.5 cm; V反总: 反应体系总体积

(L), $200\mu\text{L}=2 \times 10^{-4}$ L; 10^9 : $1\text{mol}=1 \times 10^9$ 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样: 加入反应体系中上清液体积 (mL), $20\mu\text{L}=0.02$ mL; V样总: 提取液体积, 1 mL; T: 催化反应时间 (min), 2min。

抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 活性测定试剂盒说明书注意事项:

配制好的试剂二4°C保存, 并且3天内使用完。