

抗坏血酸过氧化物 (APX) 活性检测试剂盒

(货号: SH3012 酶标法 96T)

一、产品简介

抗坏血酸过氧化物酶 (Ascorbate Peroxidase, APX, EC 1.11.1.11) 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、过氧化物酶体和乙醛酸体等细胞器中。APX 催化 H_2O_2 氧化抗坏血酸 (AsA) 生成单脱氢抗坏血酸 (MDHA), 是植物体内 AsA 的主要消耗者, 在保护叶绿体免受氧化损伤中起重要作用。

二、检测原理

抗坏血酸在 290 nm 波长处有特征吸收峰。在抗坏血酸过氧化物酶催化下, AsA 被 H_2O_2 氧化为 MDHA, 随着酶促反应的进行, 反应体系中 AsA 含量逐渐减少, 290 nm 处吸光度值随之下降。通过测定单位时间内吸光度的下降速率, 即可计算抗坏血酸过氧化物酶的活性。

三、试剂盒组分与规格

试剂名称	规格	保存条件	备注
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂×3 支	4℃ 保存	临用前甩几下或 4℃ 离心使试剂落入试管底部, 每支再加 1.5mL 蒸馏水充分溶解, 用不完的试剂分装后 -20℃ 保存 (可保存一个月), 禁止反复冻融, 解冻后可 4℃ 保存并一周内使用完。
试剂三	液体 1mL×1 瓶	4℃ 保存	

四、保存条件: 4℃ 保存, 6 个月有效。

五、所用到的仪器和用品

酶标仪、台式低温离心机、可调式移液器、96 孔板、匀浆器、无水乙醇和蒸馏水。

六、抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 活性测定

正式实验前务必选取 2-3 个预期差异较大的样本做测定, 了解本批样本情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

①组织样本: 称取约 0.1g 组织 (水分充足的样本取 0.5g 或更多), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 在 4℃ 12000g 离心 10min, 取上清待测。

【注】若样本颜色较深 (如植物叶片), 可引起起始值 A1 值较大如超过 2, 可在样本制备过程中增加除色素步骤: 取约 0.2g 组织 (水分充足样本可取 1g), 加入 1mL 90% 乙醇冰浴匀浆, 12000g 4℃ 离心 10min, 弃掉色素较深的上清液; 以上除色素步骤重复 2 次。最后向离心得到的沉淀中加入 1mL 提取液, 混匀或再次冰浴匀浆, 12000g 4℃ 离心 10min, 取上清置冰上待测。



②细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000g 4℃离心 10min，取上清待测。

③液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测

①酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 290nm，设置震荡时间 5s。

②试剂一放 25℃水浴中预热 30min（如果实验室温度达到 25℃以上，可以室温静置 30min）。

③试剂一和二可按照 150:20 比例配成混合液（一枪加 170 μ L 该混合液，该混合液用多少配多少，现配现用），试剂三需单独加。

③在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（ μ L）	测定管
样本	20
试剂一	150
试剂二	20
试剂三	10
混匀，在 25℃条件下，在 290nm 处，分别于 30s 和 5min30s 读取吸光值 A，相应记为 A1 和 A2， $\Delta A=A1-A2$	

七、结果计算

1、按样本鲜重计算：

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

$$APX(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D$$

2、按照细菌或细胞数量计算：

酶活定义：25℃条件下，每 10^4 个细胞每分钟氧化 1nmol 的 AsA 为 1 个酶活单位。

$$APX(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D$$

3、按照样本蛋白浓度计算：

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

$$APX(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div (Cpr \times V1) \div T \times D$$

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)，0.5cm； 10^6 ---1mol= $1 \times 10^6 \mu\text{mol}$ ；

V ---加入提取液体积，1mL； $V1$ ---加入样本体积，0.02mL；

$V2$ ---反应体系总体积，200 μ L= 2×10^{-4} L；

D ---稀释倍数，未稀释即为 1； W ---样本质量，g；

500 ---细胞数量，万； T ---催化反应时间，5min；

Cpr ---样本蛋白质浓度，mg/mL，推荐使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒（货号：AR0146）。