

抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性检测试剂盒说明书

Ascorbate Peroxidase Assay Kit

紫外分光光度法

货号: AK121

规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK121-A	90ml×1 瓶	4℃保存
AK121-B	粉剂×1 瓶	4℃避光保存
AK121-C	5ml×1 瓶	4℃保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 抗坏血酸过氧化物酶 (Ascorbate Peroxidase, 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, 以及过氧化物和类囊体膜上。APX 催化 H_2O_2 氧化 AsA, 是植物 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。

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。

自备用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿、低温离心机、移液枪、研钵、冰和蒸馏水。

试剂预配制:

AK121-B: 临用前加入 5mL 蒸馏水充分溶解备用, 4℃避光保存, 并且 3 天内使用完。

粗酶液提取:

按照组织质量(g):AK121-A 体积(mL)为 1:5~10 的比例(建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK121-A)冰浴匀浆, 13000g, 4℃离心 20min, 取上清置冰上待测。

检测步骤:

1. 分光光度计预热 30min, 调节波长到 290 nm, 蒸馏水调零。
2. AK121-A 置于 25℃水浴中保温 30min。
3. 在 1mL 石英比色皿中按顺序加入下列试剂:

试剂名称	测定管 (ul)
上清液	100
AK121-A	700
AK121-B	100
AK121-C	100
迅速混匀后在 290nm 测定 10 s 和 130 s 光吸收 A1 和 A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。	

计算公式:

1. 按照样本蛋白浓度计算

活性单位定义: 每毫克蛋白每分钟氧化 $1\mu\text{mol}$ AsA 为 1 个酶活单位。

$APX (U/mg \text{ prot}) = \Delta A / (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}} \times 10^6 / (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1.79 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

2. 按照样本质量计算

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

$$APX(U/g) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^6 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.79 \times \Delta A \div W$$

注： 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），1000 μ L= 1×10^{-3} L； 10^6 ：1mol= 1×10^6 μ mol；V_样：加入反应体系中上清液体积（mL），100 μ L=0.1 mL；V_{样总}：加入提取液体积，1mL；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：样本质量，g；T：催化反应时间（min），2min。