

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0340

Size: 100T/96S

抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、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。

三、需自备的仪器和用品:

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(ZC-1036:UV 板)、移液枪、研钵、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 120mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	粉剂×1 瓶	4°C 保存	临用前加 3 mL 蒸馏水充分溶解
试剂三	液体 3mL×1 瓶	4°C 保存	-

五、操作步骤：

●粗酶液提取：

称取约0.1g 样品，加1 mL 试剂一，冰上充分研磨，13000g 4℃离心20min，取上清液。

●测定：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上，调节波长到 290 nm，用蒸馏水调零。
2. 试剂一在 25℃中预热 30min 以上。
3. 空白管：依次在微量石英比色皿/96 孔板（UV 板）中加入 20 μL 蒸馏水、140 μL 预热的试剂一、20 μL 试剂二和 20 μL 试剂三，迅速混匀后在 290nm 测定 10s 和130s 光吸收 A1 和A2， ΔA 空白管=A1-A2。
4. 测定管：依次在微量石英比色皿/96 孔板（UV 板）中加入 20 μL 上清液、140 μL 预热的试剂一、20 μL 试剂二和 20 μL 试剂三，迅速混匀后在 290nm 测定 10s 和130s 光吸收 A3 和A4， ΔA 测定管=A3-A4。

六、APX 活性计算：

● 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按蛋白浓度计算

活性单位定义：每毫克蛋白每分钟氧化 1 μmol AsA 为1U。

$$\text{APX (U/mg prot)} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^6 \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T$$
$$= 1.79 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

活性单位定义：每克样品每分钟氧化 1 μmol AsA 为1U。

$$\text{APX (U/g 鲜重)} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^6 \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T = 1.79 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

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; 10^6 : $1\text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; 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, g; V 样: 加入反应体系中上清液体积 (mL) $20 \mu\text{L} = 0.02\text{mL}$; V 样总: 加入试剂一体积, 1mL;
T: 催化反应时间 (min) 2min。

● 使用96孔板 (UV板) 测定的计算公式如下

(1) 按蛋白浓度计算

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

$$\text{APX (U/mg prot)} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^6 \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T \\ = 3 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

活性单位定义: 每克样品每分钟氧化 $1 \mu\text{mol}$ AsA 为1U。

$$\text{APX (U/g 鲜重)} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^6 \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T \\ = 3 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

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) 0.6 cm;
V 反总: 反应体系总体积 (L) $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4}$ L; 10^6 : $1\text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; 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 (货号: ZC-S0470); W : 样品质量, g; V 样: 加入反应体系中上清液体积 (mL) $20 \mu\text{L} = 0.02\text{mL}$; V 样总: 加入试剂一体积, 1mL; T: 催化反应时间 (min) 2min。