

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-S0613

Size: 50T/48S

抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

*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 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,在胁迫和解胁迫条件下,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 的氧化速率,可计算得 APX 活力。

三、需自备的仪器和用品:

低温离心机、紫外分光光度计、1mL 石英比色皿、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 90mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4°C 保存	临用前加入 5mL 双蒸水充分溶解
试剂三	液体 5 mL×1 瓶	4°C 保存	

五、操作步骤：

● 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°C离心 20min, 取上清置冰上待测。

● 测定操作表：

1. 分光光度计预热 30 min 以上, 调节波长到 290 nm, 用蒸馏水调零。
2. 试剂一在 25°C中预热 30min 以上。
3. 空白管: 依次在 1mL 石英比色皿中加入 100 μL 蒸馏水、700 μL 预热的试剂一、100 μL 试剂二和 100 μL 试剂三, 迅速混匀后在 290nm 测定 10 s 和 130 s 光吸收 A1 和 A2, ΔA 空白管=A1-A2。
4. 测定管: 依次在 1mL 石英比色皿中加入 100 μL 上清液、700 μL 预热的试剂一、100 μL 试剂二和 100 μL 试剂三, 迅速混匀后在 290nm 测定 10 s 和130 s 光吸收 A3 和A4, ΔA 测定管=A3-A4。

六、APX 活力计算：

(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 1 μmol AsA 为 1U。

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

ϵ : AsA 在290nm 处摩尔吸光系数为 $2.8 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 比色皿光径 (cm) 1 cm; V 反总: 反应体系总体积(L) $1000 \mu\text{L} = 1 \times 10^{-3} \text{ L}$; $10^6: 1 \text{ mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; 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); V 样: 加入反应体系中上清液体积 (mL) $100 \mu\text{L} = 0.1 \text{ ml}$; T : 催化反应时间 (min) 2min。

(2) 按样本质量计算

单位的定义：每 g 组织每分钟氧化 $1 \mu\text{mol}$ AsA 为 1U。

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

ε : AsA 在 290nm 处摩尔吸光系数为 $2.8 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 比色皿光径 (cm) 1 cm;
 V 反总: 反应体系总体积 (L), $1000 \mu\text{L} = 1 \times 10^{-3} \text{ L}$; 106 : $1 \text{ mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; V 样: 加入反应体系中上清液体积 (mL), $100 \mu\text{L} = 0.1 \text{ mL}$; V 样总: 加入试剂一体积, 1mL; W , 样本质量, g; T : 催化反应时间 (min), 2min。