

上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

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

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。

产品内容：

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℃保存	-
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃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℃保存	-

产品说明：

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。

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。

试验中所需的仪器和试剂：

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。

操作步骤：

一、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。

二、测定操作表：

a. 分光光度计预热 30 min 以上，调节波长到 290 nm，用蒸馏水调零。

b. 试剂一在 25℃中预热 30min 以上。

c. 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。

d. 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。

三、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 $1 \mu\text{mol}$ AsA 为 1U。

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

$$= 1.79 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{Cpr}$$

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； $V_{\text{反总}}$ ：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； $V_{\text{样}}$ ：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； $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积 (L)， $1000 \mu\text{L} = 1 \times 10^{-3} \text{L}$ ； 10^6 ： $1 \text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$ ； $V_{\text{样}}$ ：加入反应体系中上清液体积

(mL)， $100 \mu\text{L} = 0.1 \text{mL}$ ； $V_{\text{样总}}$ ：加入试剂一体积，1mL； W ，样本质量，g； T ：催化反应时间 (min)，2min。