

抗坏血酸过氧化物酶 (Ascorbate peroxidase, APX) 试剂盒说明书

(货号: ADS-F-VC005 紫外法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

抗坏血酸过氧化物酶 (APX; EC 1.11.1.11) 也称维生素 C 过氧化物酶, 是植物细胞中防御外界氧化胁迫和植物本身活性氧代谢的重要抗氧化酶类, 在降低 H_2O_2 对植物细胞产生氧化损伤方面起关键作用。

抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 首先与 H_2O_2 形成中间复合物, 中间复合物接着氧化 AsA, 因此 APX 与 AsA 具有一定的负相关性, 通过测定 AsA 氧化速率, 来计算 APX 酶活性。

二、试剂盒组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉剂 2 支 空瓶 2 个	4°C 保存	每支: 1. 临用前向其中一支冻存管 (加水前先甩几下使微量试剂落入底部) 中加入 0.5mL 蒸馏水使试剂完全溶解, 液体全部转移至一个空试剂瓶中; 2. 再向该冻存管中加 0.5mL 蒸馏水涮洗并转移至试剂瓶中; 最后向该试剂瓶中加入 2mL 蒸馏水 (共 3mL), 混匀做为试剂二备用; 3. 制备好的试剂二可 -20°C 分装冻存 (可保存一个月), 禁止反复冻融, 解冻后可 4°C 保存并一周内使用完。
试剂三	液体 6mL×1 瓶	4°C 避光保存	

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取: 取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4°C 离心 20min, 取上清置冰上待测。

【注意】若样本颜色较深 (如植物叶片), 可引起起始值 A_{1} 值较大如超过 2, 可在样本提取过程中增加除色素步骤: 取约 0.2g 组织 (水分充足的样本可取 1g), 加入 90% 乙醇冰浴匀浆, 12000rpm, 4°C 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, 12000rpm, 4°C 离心 10min, 取上清置冰上待测。

2、检测步骤:

- ① 紫外分光光度计预热 30 min, 调节波长到 290nm, 用蒸馏水调零。
- ② 试剂一放 25°C 水浴中预热 30min (如果实验室温度达到 25°C 以上, 可以静置 30min)
- ③ 依次在 1mL 石英比色皿 (光径 1cm) 中加入:

试剂组分 (μ L)	测定管
样本	60
试剂一	740

试剂二	100
试剂三	100
混匀，25°C条件下，在 290nm 处，分别于 30 s 和 5min30 s 处读取吸光值 A，相应记为 A1 和 A2， $\Delta A=A1-A2$ 。	

- 【注】1.若 ΔA 值小于 0.01，可适当延长反应时间 T（如由 5min30s 延长到 10min30s 或更长时间读取 A2）。或适当加大样本量 V1（如由 60 μ L 增至 120 μ L，则试剂一相应减少），则改变后的 T 和 V1 需代入公式重新计算。
- 2.若起始值 A 太大如超过 2（如颜色较深的植物叶片，一般色素较高，则起始值相对会偏高），可对叶片进行除色素处理（参考样本提取阶段注意事项）或适当减少样本加样量 V1（如由 60 μ L 减至 40 μ L，则试剂一相应增加），则改变后的 V1 需代入公式重新计算。
- 3.若下降趋势不稳定，可以每隔 10S 读取一次吸光值，选取一段线性下降的时间段来参与计算，相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按蛋白浓度计算：

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

$$APX(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot})=\Delta A\div(\epsilon\times d)\times V2\times 10^6\div(\text{Cpr}\times V1)\div T=1.19\times\Delta A\div \text{Cpr}$$

2、按质量计算：

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

$$APX(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=\Delta A\div(\epsilon\times d)\times V2\times 10^6\div(W\times V1\div V)\div T=1.19\times\Delta A\div W$$

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; 10^6 ---1mol=1 $\times 10^6$ μ mol;

W---样本质量，g; V---加入提取液体积，1mL;

V1---加入反应体系中上清液体积 (mL)，60 μ L=0.06mL;

V2---反应体系总体积 (L)，1000 μ L=1 $\times 10^{-3}$ L;

T---催化反应时间 (min)，5min,

Cpr---上清液蛋白质浓度 (mg/mL)，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。