

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

(货号: G0203F 紫外法 48 样)

一、产品简介:

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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
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 mg×2 支 空瓶×2 个	4°C 保存	临用前向其中一支冻存管 (加水前先用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, 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。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 保存	

三、所需仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、低温离心机、移液枪、研钵、冰和蒸馏水。

四、抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

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 10min, 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, 可在样本制备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 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 在 4°C 或冰浴进行匀浆 (或使用各类常见电动匀浆器)。4°C 约 12,000rpm 离心 10min, 取上清待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^8): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、上机检测:

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 试剂一和二可按照 740:100 比例配成混合液 (一枪加 840 μ L 该混合液) (该混合液用多

少配多少，现配现用），试剂三需单独加。

③ 依次在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中加入：

试剂名称 (μL)	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， $\Delta A=A1-A2$ 。	

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 1μmol AsA 为 1 个酶活单位。

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

2、按质量计算：

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

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

3、按细胞数量计算：

酶活定义：25°C条件下，每 10⁴ 个细胞每分钟氧化 1nmol 的 AsA 为 1 个酶活单位。

$$APX(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 1190.5 \times \Delta A \div 500$$

ϵ ---AsA 在 290nm 处摩尔吸光系数为 $2.8 \times 10^3 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$;

d---比色皿光径 (cm)，1 cm;

10^6 ---1mol=1×10⁶μmol;

W---样本质量，g;

500---细胞数量，万;

V---加入提取液体积，1mL;

V1---加入反应体系中上清液体积 (mL)，60μL=0.06mL;

V2---反应体系总体积 (L)，1000μL=1×10⁻³L;

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。