

抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 活性测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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 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。

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。

组成:

产品名称	VC010-100T/96S	Storage
试剂一: 液体	120ml	4°C
试剂二: 粉剂	1 瓶	4°C
试剂三: 液体	3ml	4°C
说明书	一份	

试剂二: 粉剂×1 瓶, 4°C 保存。临用前加 3 ml 蒸馏水充分溶解。

自备仪器和用品:

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 (UV 板)、移液枪、研钵、冰和蒸馏水。

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:

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上, 调节波长到 290nm, 用蒸馏水调零。
2. 试剂一在 25°C 中预热 30min。



3.依次在微量石英比色皿/96孔板中加入20 μ l上清液、140 μ l预热的试剂一、20 μ l试剂二和20 μ l试剂三，迅速混匀后在290nm测定10s和130s光吸收A1和A2， $\Delta A=A1-A2$ 。

APX 活性计算：

a.使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(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1nmol AsA 为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{APX}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 1786 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：每g组织每分钟氧化1nmol AsA 为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{APX}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 1786 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

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; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积 (L), $200\mu\text{l}=2 \times 10^{-4}$ L; 10^9 : $1\text{mol}=1 \times 10^9\text{nmol}$; 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; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积 (ml), $20\mu\text{l}=0.02\text{ml}$; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1 ml; T : 催化反应时间 (min), 2min。

b.使用96孔板测定的计算公式如下

(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1nmol AsA 为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{APX}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 3571 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：每g组织每分钟氧化1nmol AsA 为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{APX}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 3571 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

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), 0.5 cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积 (L), $200\mu\text{l}=2 \times 10^{-4}$ L; 10^9 : $1\text{mol}=1 \times 10^9\text{nmol}$; 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; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积 (ml), $20\mu\text{l}=0.02\text{ml}$; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1 ml; T : 催化反应时间 (min), 2min。

注意事项：

配制好的试剂二4 $^{\circ}$ C保存，并且3天内使用完。

