

## 抗坏血酸过氧化物酶（APX）活性检测试剂盒说明书

### Ascorbate Peroxidase Assay Kit

微量法

货号：AK122

规格：100T/96S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
AK122-A	120ml×1 瓶	4℃保存
AK122-B	粉剂×1 瓶	4℃避光保存
AK122-C	3ml×1 支	4℃保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介：

意义：抗坏血酸过氧化物酶 (Ascorbate Peroxidase, 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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，APX 与 AsA 具有一定的负相关性。

原理：APX 催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化 AsA，通过测定 AsA 氧化速率，来计算得 APX 活性。

自备用品：

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、移液枪、研钵、冰和蒸馏水。

试剂预配制：

AK122-B：临用前加入 3mL 蒸馏水充分溶解备用，4℃避光保存，并且 3 天内使用完。

粗酶液提取：

按照组织质量(g)：AK122-A 体积(mL)为 1：5~10 的比例(建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL AK122-A)冰浴匀浆，13000g，4℃离心 20min，取上清置冰上待测。

检测步骤：

1. 分光光度计预热 30min，调节波长到 290 nm，蒸馏水调零。
2. AK122-A 置于 25℃水浴中保温 30min。
3. 在 1mL 石英比色皿中按顺序加入下列试剂：

试剂名称	测定管 (ul)
上清液	20
AK122-A	140
AK122-B	20
AK122-C	20
迅速混匀后在 290nm 测定 10 s 和 130 s 光吸收 A1 和 A2， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

计算公式：

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 按照样本蛋白浓度计算

活性单位定义：每毫克蛋白每分钟氧化 1 $\mu$ mol AsA 为 1 个酶活单位。

$$APX (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^6 \div (C_{\text{pr}} \times V \text{ 样}) \div T = 1.79 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2. 按照样本质量计算

活性单位定义：每 g 组织每分钟氧化 1 $\mu$ mol AsA 为 1 个酶活单位。

$$APX (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^6 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.79 \times \Delta A \div W$$

**注：**  $\epsilon$ ：AsA 在 290nm 处摩尔吸光系数为  $2.8 \times 10^3$  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； $10^6$ ： $1\text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$ ；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；  
 $W$ ：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. 按照样本蛋白浓度计算

活性单位定义：每毫克蛋白每分钟氧化 1 $\mu$ mol AsA 为 1 个酶活单位。

$$APX (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^6 \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 3.58 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按照样本质量计算

活性单位定义：每 g 组织每分钟氧化 1 $\mu$ mol AsA 为 1 个酶活单位。

$$APX (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^6 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3.58 \times \Delta A \div W$$

**注：**  $\epsilon$ ：AsA 在 290nm 处摩尔吸光系数为  $2.8 \times 10^3$  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； $10^6$ ： $1\text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$ ；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；  
 $W$ ：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。