

使用说明书

Instruction Manual

抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性检测试剂盒（微量法）

Ascorbate Peroxidase Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

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_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，APX 与 AsA 具有一定的负相关性。

检测原理

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。

产品组成及储存条件

100T/96S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0028M-A	120mL×1 瓶	4℃保存
CB0028M-B	粉剂×1 瓶	4℃避光保存
CB0028M-C	3mL×1 支	4℃保存

注：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

操作说明

一、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（UV 板）、移液枪、研钵、冰和蒸馏水。

二、试剂预配制：

CB0028M-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。

三、粗酶液提取：

按照组织质量（g）：CB0028M-A 体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL CB0028M-A）冰浴匀浆，13000g，4℃离心 20min，取上清置冰上待测。

四、检测步骤：

- 紫外分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长到 290 nm，蒸馏水调零。
- CB0028M-A 置于 25℃水浴中保温 30min。
- 在 1mL 石英比色皿中按顺序加入下列试剂：

试剂名称	测定管 (μL)
上清液	20
CB0028M-A	140
CB0028M-B	20
CB0028M-C	20
迅速混匀后在 290nm 测定 10 s 和 130 s 光吸收 A1 和 A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。	

五、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 1μmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$APX (U/mg \text{ prot}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^6 \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T = 1.79 \times \Delta A \div Cpr$$

2. 按照样本质量计算

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

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

注： 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)， $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ； 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 TargetMol 生产的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒(C0050)； 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 1μmol AsA 为 1 个酶活单位。

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

2. 按照样本质量计算

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

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

注： 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)，0.5cm； $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积 (L)， $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ； 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 TargetMol 生产的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒(C0050)； 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

1. 蛋白定量测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
2. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

