

使用说明书

Instruction Manual

抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性检测试剂盒（紫外分光光度法）

Ascorbate Peroxidase Assay Kit (UV Spectrophotometry)

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 具有多种同功酶，分别定位于叶绿体、胞质、线粒体、过氧化物和乙醛酸体，以及过氧化体和类囊体膜上。APX 催化 H₂O₂ 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 H₂O₂ 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

50T/48S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0028UV-A	90mL×1 瓶	4°C 保存
CB0028UV-B	粉剂×1 瓶	4°C 避光保存
CB0028UV-C	5mL×1 瓶	4°C 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：

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿、低温离心机、移液枪、研钵、冰和蒸馏水。

二、试剂预配制：

CB0028UV-B：临用前加入 5mL 蒸馏水充分溶解备用，4°C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)：CB0028UV-A 体积(mL)为 1: 5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL CB0028UV-A）冰浴匀浆，13000g，4°C离心 20min，取上清置冰上待测。

四、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. CB0028UV-A 置于 25°C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 (μL)
上清液	100
CB0028UV-A	700
CB0028UV-B	100
CB0028UV-C	100
迅速混匀后在 290nm 测定 10 s 和 130 s 光吸收 A1 和 A2, $\Delta\text{A}=\text{A}_1-\text{A}_2$ 。	

五、计算公式：

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 $1\mu\text{mol AsA}$ 为 1 个酶活单位。

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

2. 按照样本质量计算

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

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

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), $1000\mu\text{L}=1 \times 10^{-3} \text{ L}$; 10^6 : $1\text{mol}=1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积 (mL), $100\mu\text{L}=0.1 \text{ mL}$; $V_{\text{总}}$: 加入提取液体积, 1mL; C_{pr} : 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 : 样本质量, g; T : 催化反应时间 (min), 2min。

注意事项

- 蛋白定量测定, 建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
- 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。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

