

## 抗坏血酸过氧化物酶 (ascorbate peroxidase, APX) 活性测定试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

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。

### 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	VC009-50T/48S	Storage
试剂一：液体	90ml	4°C
试剂二：粉剂	1 瓶	4°C
试剂三：液体	5ml	4°C
说明书	一份	

试剂二：粉剂×1 瓶，4°C 保存。临用前加 5 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、1ml 石英比色皿、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. 分光光度计预热 30 min，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 1ml 石英比色皿中加入 100 $\mu$ l 上清液、700 $\mu$ l 预热的试剂一、100 $\mu$ l 试剂二和 100 $\mu$ l 试剂三，迅速混匀后在 290nm 测定 10 s 和 130 s 光吸收 A1 和 A2， $\Delta A=A1-A2$ 。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



### APX 活性计算公式：

(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。

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

(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。

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

$\epsilon$ : 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;  $V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积 (L),  $1000\mu\text{l} = 1 \times 10^{-3} \text{ L}$ ;  $10^9$ :  $1\text{mol} = 1 \times 10^9 \text{ nmol}$ ;  $V_{\text{样}}$ : 加入反应体系中上清液体积 (ml),  $100\mu\text{l} = 0.1 \text{ ml}$ ;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 1ml;  $\text{Cpr}$ : 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;  $W$ : 样本质量, g;  $T$ : 催化反应时间 (min), 2min。

### 注意事项：

配制好的试剂二 4°C 保存, 并且 3 天内使用完。

