

抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 测试盒说明书(精简版)

(货号A123-1-1 分光光度法 50管/48样)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 预试后再进行批量实验, 否则由此导致的后果用户自行承担!

一、测定意义:

抗坏血酸过氧化物酶 (Ascorbate Peroxidase, APX) 是以抗坏血酸为电子供体且专一性强的过氧化物酶, 主要存在于植物叶绿体和胞浆中, 是叶绿体中清除H₂O₂关键酶, 也是抗坏血酸代谢的重要抗氧化酶。H₂O₂是植物叶绿体中光合电子传递链和某些酶反应的天然产物, 是具有毒害作用的活性氧。APX具有多种同工酶, 主要分为两大类型: 一种为位于叶绿体中并分解叶绿体中的H₂O₂的叶绿体型同工酶; 另一种为位于叶绿体之外的其它细胞组分 (分别定位于胞质、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) 的细胞质型同工酶。

二、测定原理:

抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 催化抗坏血酸 (ASA) 与过氧化氢 (H₂O₂) 反应, 使ASA氧化成单脱氢抗坏血酸 (MDASA)。随着ASA被氧化, 溶液中290nm波长下的吸光度值 (A₂₉₀) 下降, 根据单位时间内A₂₉₀减少值, 计算抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 活性。ASA氧化量按消光系数2.8(mol/mL)/cm计算。

三、自备仪器用品:

低温离心机、紫外分光光度计、1cm光径石英比色皿、移液枪、研钵、冰和蒸馏水

四、试剂组成和配制:

试剂编号	试剂名称	试剂装量	保存条件
R1	缓冲液	100mL×1 瓶	4℃ 保存
R2	底物粉剂	1 瓶	4℃ 保存
底物液配制: 临用前一瓶 R2 加入 5mL 双蒸水充分溶解			
R3	基质液	5mL×1 瓶	4℃ 保存

五、储存条件及有效期:

试剂于 2~8℃ 保存可稳定 3 个月。

六、操作步骤

1、粗酶液提取:

按组织质量 (g): 缓冲液体积 (mL) = 1:9 的比例加入试剂一 (如0.1g组织加入0.9mLR1缓冲液), 冰水浴匀浆, 10000rpm/min, 离心10min, 取上清待测。

2、操作表:

试剂	空白管	测定管
双蒸水 (μL)	100	
样本 (μL)		100
R1 (μL)	700	700
R2 (μL)	100	100
R3 (μL)	100	100
迅速混匀, 双蒸水调零, 波长 290nm, 1cm 光径石英比色皿, 测定10s和130s光吸光度值A ₀ 和A ₁ , ΔA=A ₀ -A ₁		

注: 1、测定之前将双蒸水及试剂一在37℃中预热30min 以上。

2、建议分光光度计预热30min 以上, 调节波长到290nm, 双蒸水调零。

3、建议第二次比色前(120秒左右)将反应液重新倒入试管, 充分混匀后再比色(消除反应中产生的气泡干扰)。

七、APX活性计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每毫克蛋白每分钟在每mL反应体系中催化1μmol ASA为1个活力单位 (U)。

$$\text{APX活性 (U/mgprot)} = \frac{\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\epsilon \times d} \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}} \times \text{Cpr}} \div T$$

ϵ : 消光摩尔系数(ASA在290nm 处摩尔消光系数为2.8μmol/mL/cm);

d : 比色皿光径, 1cm;

10^6 : 1mol=10⁶ μmol;

$V_{\text{反应}}$: 反应体系总体积, 1mL;

$V_{\text{样}}$: 取样量, 0.1mL;

T : 反应时间, 2min。

Cpr : 待测样本蛋白质浓度 (mgprot/mL), 需另外测定, 建议使用本所BCA蛋白定量测定试剂盒;

(2) 按样本质量计算:

单位定义: 每克组织每分钟在每mL反应体系中催化1μmol ASA为1个活力单位 (U)

$$\text{APX活性 (U/g组织)} = \frac{\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\epsilon \times d} \times \frac{V_{\text{反应}} \times V_{\text{提}}}{V_{\text{样}} \times W} \div T \times N$$

$V_{\text{提}}$: 提取液总体积, mL;

W : 样本鲜重, g;

N : 样本测试前稀释倍数。