



抗坏血酸过氧化物酶（APX）测试盒说明书

（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、所需仪器及试剂：

低温离心机、紫外分光光度计、1cm光径石英比色皿（1mL容量规格）、不同规格移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、试剂组成与配制：（试剂盒有效期6个月）

试剂编号	试剂名称	试剂规格	保存条件
试剂一	缓冲液	100mL×1 瓶	4℃保存
试剂二	底物粉剂	1 支	4℃保存
	底物液配制：临用前将一支试剂二粉剂加到5mL 蒸馏水中，充分溶解备用。配好的底物液在4℃可保存1周。		
试剂三	基质液	5mL×1 瓶	4℃保存

五、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（建议0.1g组织加入0.9mL试剂一），冰水浴匀浆，10000rpm离心10min，取上清待测。

2、操作表：

试剂	空白管	测定管
蒸馏水（μL）	100	
样本（μL）		100
试剂一（μL）	700	700
试剂二底物液（μL）	100	100
试剂三（μL）	100	100
迅速混匀，蒸馏水调零，波长290nm，1cm光径石英比色皿（1mL容积），紫外分光光度计测定10s和130s的吸光度值A ₀ 和A ₁ ，ΔA=A ₀ -A ₁		

注：1、测定之前将蒸馏水及试剂一在37℃中预热30min 以上。

- 建议分光光度计预热30min 以上，调节波长到290nm，蒸馏水调零。
- 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)。

六、APX活性计算：

（1）样本按蛋白计算：

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

$$\text{APX活性 (U/mg 蛋白)} = \frac{(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times 10^6}{\epsilon \times d} \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}} \times \text{Cpr}} \div T \times N$$

（2）样本按质量计算：

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

$$\text{APX活性 (U/g 组织)} = \frac{(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times 10^6}{\epsilon \times d} \times \frac{V_{\text{反应}} \times V_{\text{提}}}{V_{\text{样}} \times W} \div T \times N$$

以上两种公式中：

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

d:比色皿光径，1cm；

10⁶:1mol=10⁶ μmol；

V_{反应}: 反应体系总体积，1mL；

V_样: 取样量，0.1mL；

T: 反应时间，2min。

Cpr: 样本匀浆上清液蛋白浓度（mg/mL），需另外测定，建议使用本公司BCA蛋白定量测定试剂盒（货号A045-3/-4）；

V_提: 匀浆液总体积，mL；

W: 样本鲜重，g；

N: 样本测试前稀释倍数。