

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

注 意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

自备仪器用品：

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。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 90mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加 5 mL 蒸馏水充分溶解。

试剂三：液体 5mL×1 支，4℃ 保存。

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℃ 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℃ 中预热 30min。

3. 依次在 1mL 石英比色皿中加入 100 μ L 上清液、700 μ L 预热的试剂一、100 μ L 试剂二和 100 μ L 试剂三，迅速混匀后在 290nm 测定 10 s 和 130 s 光吸收 A1 和 A2， $\Delta A=A1-A2$ 。

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。

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

(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。

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

ϵ ：AsA 在 290nm 处摩尔吸光系数为 2.8×10^3 L/mol/cm；d：比色皿光径 (cm)，1 cm；V 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 样: 加入反应体系中上清液体积 (mL), $100\mu\text{L}=0.1\text{mL}$; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; 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℃ 保存, 并且 3 天内使用完。