

抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 测试盒

(货号: BC104 分光光度法 50 管/48 样)

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 H_2O_2 关键酶, 也是抗坏血酸代谢的重要抗氧化酶。 H_2O_2 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 H_2O_2 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 (H_2O_2) 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 (A_{290}) 下降, 根据单位时间内 A_{290} 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 $2.8(\text{mol}/\text{mL})/\text{cm}$ 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 (1mL容量规格)、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°C 保存
R2	底物粉剂	1 瓶	4°C 保存
底物液配制: 临用前一瓶 R2 加入 5mL 蒸馏水充分溶解			
R3	基质液	5mL×1 瓶	4°C 保存

五、储存条件及有效期:

试剂于 2~8°C 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 0.9mL R1 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
蒸馏水 (μL)	100	
样本 (μL)		100
R1 (μL)	700	700
R2 (μL)	100	100
R3 (μL)	100	100

迅速混匀，蒸馏水调零，波长 290nm，1cm 光径石英比色皿，紫外分光光度计测定 10s 和 130s 的吸光度值 A_0 和 A_1 ， $\Delta A = A_0 - A_1$

- 注：** 1、测定之前将蒸馏水及试剂一在 37°C 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，蒸馏水调零。
 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 1 μ mol 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 2.8 μ mol/mL/cm);

d : 比色皿光径, 1cm;

10^6 : 1mol = 10⁶ μ mol;

$V_{\text{反应}}$: 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；

计算举例： 取水稻叶片 0.1g，加缓冲液 0.9mL，制备成匀浆上清，测得空白管吸光度 A_0 为 0.512， A_1 为 0.508， $\Delta A_{\text{空白}}$ 为 0.004，测定管吸光度 A_0 为 0.849， A_1 为 0.760， $\Delta A_{\text{测定}}$ 为 0.089。测得样本蛋白浓度为 0.3528mgprot/mL。将数据代入计算公式将数据代入计算公式：

$$\begin{aligned} \text{APX 活性 (U/mgprot)} &= \frac{0.089 - 0.004}{2.8 \times 1} \times \frac{1}{0.1 \times 0.3258} \div 2 \\ &= 0.4302 \text{ U/mgprot} \end{aligned}$$

(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 1 μ mol 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。

计算举例： 取番茄叶片 0.1g，加缓冲液 0.9mL，制备成匀浆上清，测得空白管吸光度 A_0 为 0.510， A_1 为 0.506， $\Delta A_{\text{空白}}$ 为 0.004，测定管吸光度 A_0 为 0.800， A_1 为 0.752， $\Delta A_{\text{测定}}$ 为 0.048。将数据代入计算公式将数据代入计算公式：

$$\begin{aligned} \text{APX 活性 (U/mgprot)} &= \frac{0.048 - 0.004}{2.8 \times 1} \times \frac{1 \times 0.9}{0.1 \times 0.1} \div 2 \\ &= 0.7071 \text{ U/g组织} \end{aligned}$$