

抗坏血酸过氧化物酶（APX）检测试剂盒（微量法）

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，以及过氧化体和类囊体膜上。APX 催化 H_2O_2 氧化 AsA，是植 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。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 120mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加 3 mL 蒸馏水充分溶解。

试剂三：液体 3mL×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。

测定步骤：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上，调节波长到 290nm，用蒸馏水调零。
2. 试剂一在 25℃ 中预热 30min。
3. 依次在微量石英比色皿/96 孔板中加入 20 μ L 上清液、140 μ L 预热的试剂一 20 μ L 试剂二和 20 μ L 试剂三，迅速混匀后在 290nm 测定 10s 和 130s 光吸收 A1 和 A2， $\Delta A=A1-A2$ 。

APX 活性计算：

a.使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(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。

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

(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), $200\mu\text{L} = 2 \times 10^{-4}$ L;

10^9 : $1\text{mol} = 1 \times 10^9 \text{nmol}$;

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 : 样品质量;

V 样: 加入反应体系中上清液体积 (mL), $20\mu\text{L} = 0.02\text{mL}$;

V 样总: 提取液体积, 1 mL;

T: 催化反应时间 (min), 2min。

b.使用 96 孔板测定的计算公式如下

(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。

$$\begin{aligned} \text{APX}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 3571 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{APX}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 3571 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

ϵ : AsA 在 290nm 处摩尔吸光系数为 2.8×10^3 L/mol/cm;

d: 96 孔板光径 (cm), 0.5 cm;

V 反总: 反应体系总体积 (L), $200\mu\text{L} = 2 \times 10^{-4}$ L;

10^9 : $1\text{mol} = 1 \times 10^9 \text{nmol}$;

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 : 样品质量;

V 样: 加入反应体系中上清液体积 (mL), $20\mu\text{L} = 0.02\text{mL}$;

V 样总: 提取液体积, 1 mL;

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。