北京沃凯生物科技有限公司
全国免费电话:400-819-385
www.bjoka-vip.com
Tel:010-62971590. Fax:62340519
M-ail:postmaster@oka-vip.com

抗坏血酸过氧化物酶（APX）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：D17088

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
粉剂一	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 40 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×2 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 0.25mL×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

1、 提取液：临用前将粉剂一倒入提取液中，溶液为悬浊液，摇匀使用即可，2-8℃可以保存 12 周。

2、 试剂二：临用前加入 10 mL 蒸馏水充分溶解；2-8℃可以保存 1 周。（由于试剂稳定性较差，故多给一瓶）

3、 试剂三：使用前先离心。临用前根据样本量取适量试剂三用蒸馏水稀释 100 倍使用即可。

产品说明：

APX（EC.1.11.1.11）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 具有多种同功酶，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，是植物 AsA 的主要消耗者。APX 的活性直接影响到 AsA 的含量，在胁迫和解胁迫条件下，APX 与 AsA 具有一定的负相关性。

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。

$$\text{Ascorbic Acid （290nm）} \xrightarrow[H_2O_2]{\text{Ascorbate peroxidase}} \text{Ascorbic Acid}$$

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿、低温离心机、移液枪、研钵/匀浆器、水浴锅、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液）进行冰浴匀浆。13000g，4℃离心 20min，取上清置冰上待测。

二、测定步骤

1. 分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 290nm，用蒸馏水调零。

2. 试剂一在 25℃中预热 30min 以上。

3. 操作表：（在石英比色皿中加入下列试剂）

试剂名称（μL）	测定管	空白管
样本	100	-
蒸馏水	-	100
试剂一	700	700
试剂二	100	100
试剂三	100	100
将上述试剂依次加入石英比色皿中，迅速混匀，测定 290nm 处 10s 及 130s 的吸光值，记为 A1 和 A2，计算 ΔA 测定管=A1 测定管-A2 测定管，ΔA 空白管=A1 空白管-A2 空白管，空白管只需做 1-2 次。		

三、APX 活力计算

（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 1μmol AsA 为 1 个酶活单位。

APX 活性(U/mg prot) = (ΔA 测定管-ΔA 空白管)÷(ε×d）×V 反总×10^6÷(Cpr×V 样)÷T

= 1.79×(ΔA 测定管-ΔA 空白管) ÷ Cpr

（2）按样本质量计算

单位的定义：每 g 组织每分钟氧化 1μmol AsA 为 1 个酶活单位。

APX 活性(U/g 质量) = (ΔA 测定管-ΔA 空白管)÷(ε×d）×V 反总×10^6÷(W×V 样÷V 样总)÷T

= 1.79×(ΔA 测定管-ΔA 空白管) ÷W

ε：AsA 在 290nm 处摩尔吸光系数，2.8×10^3 L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 反总：反应体系总体积，1000μL=1×10^{-3}L；10^6：单位换算系数，1mol=1×10^6μmol；V 样：加入反应体系中样本体积，100μL=0.1mL；Cpr：样本蛋白质浓度（mg/mL），需要另外测定；V 样总：加入提取液体积，1mL；W：样本质量，g；T：催化反应时间，2min。

相关发表文献：

[1] Meng C, Quan T Y, Li Z Y, et al. Transcriptome profiling reveals the genetic basis of alkalinity tolerance in wheat[J]. BMC genomics, 2017, 18(1): 24.

[2] Qin Y, Djabou A S M, An F, et al. Proteomic analysis of injured storage roots in cassava (Manihot esculenta Crantz) under postharvest physiological deterioration[J]. PloS one, 2017, 12(3).

[3] Zhang Z, Liu H, Sun C, et al. A C2H2 zinc-finger protein OsZFP213 interacts with OsMAPK3 to enhance salt tolerance in rice[J]. Journal of plant physiology, 2018, 229: 100-110.

[4] Zhao Y, Yu W, Hu X, et al. Physiological and transcriptomic analysis revealed the involvement of crucial factors in heat stress response of Rhododendron hainanense[J]. Gene, 2018, 660: 109-119.

[5] Djabou A S M, Qin Y, Thaddee B, et al. Effects of Calcium and Magnesium Fertilization on Antioxidant Activities during Cassava Postharvest Physiological Deterioration[J]. Crop Science, 2018, 58(3): 1385-1392.

参考文献：

[1] Shigeoka S, Nakano Y, Kitaoka S. Metabolism of hydrogen peroxide in Euglena gracilis Z by L-ascorbic acid peroxidase[J]. Biochemical Journal, 1980, 186(1): 377.

[2] Caverzan A, Passaia G, Rosa S B, et al. Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection[J]. Genetics and molecular biology, 2012, 35(4): 1011-1019.

实验实例：

1、 取 0.1g 小蓟样本加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清，之后按照测定步骤操作，用 1mL 石英比色皿测得计算 ΔA 空白管= A1 空白管-A2 空白管=0.668-0.659=0.009，ΔA 测定管= A1 测定管-A2 测定管=0.958-0.824=0.134，按样本质量计算酶活得：

APX 活性（U/g 质量）=1.79×(ΔA 测定管-ΔA 空白管) ÷W=1.79×（0.134-0.009）÷0.1=2.23 U/g 质量。

流程图：

