抗坏血酸过氧化物酶（APX）活性测定说明书

分光法 48 样

货号：RCM0403B-48样

一、产品说明

抗坏血酸过氧化物酶（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 H2O2 依赖的 L-抗坏血酸氧化作用，对抗坏血酸表现出高度的专一性。通过调控产生的 APX 可调节细胞中的氧化还原信号，进而提高植物对非生物胁迫的耐受性。

APX 催化催化 H_2O_2 氧化 AsA，通过测定 AsA 氧化速率，来计算得 APX 活性。

二、自备仪器和用品

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。

三、试剂组成

试剂名称	规格	保存温度	配置方法	备注
试剂一	液体 90mL×1 瓶	4℃保存		
试剂二	粉剂×2 瓶	4℃保存	临用前每瓶加 5 mL 蒸馏水	现用现配
试剂三	液体 200μL×1 支	4℃保存	临用前取 50μL 试剂三加入 5mL 蒸馏水	现用现配

四、样本制备

建议正式实验前取 2 个样本做预测定，了解本批样本含量情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

①组织样本：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 试剂一，冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

②细菌/细胞样本：先收集细菌/细胞到离心管中，离心弃上清；取 500 万细菌/细胞加入 1mL 试剂一超声破碎细菌/细胞（冰浴，功率 20%或 200w，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

③液体样本：直接检测

五、APX 活性测定：

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、三使用前平衡至室温。
3. 在 1mL **石英比色皿中**依次加入下列试剂

试剂名称（μL）	测定管
上清液	100
试剂一	700
试剂二	100
稀释后试剂三	100
混匀，分别测定 10 s 和 130 s 时的吸光值 A1 和 A2，计算△A=A1-A2	

注：如果吸光值 A1 大于 2 或者反应结束后比色皿中有很明显的气泡，可以将上清液稀释 5 倍或者 10 倍进行检测；若△A 小于 0.005，可将样本浓缩进行检测，建议取 0.2g 样本加 1mL 提取液

六、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。

APX(nmol/min/mg prot) = △A÷(ε×d）×V 反总×10^9÷(Cpr×V 样)÷T

=1786×△A÷ Cpr

（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。

APX(nmol/min/g 鲜重) = △A÷(ε×d）×V 反总×10^9÷(W×V 样÷V 样总)÷T

=1786×△A ÷W

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），1000μL=1×10^{-3} L；10^9：1mol=1×10^9nmol；V 样：加入反应体系中上清液体积（mL），100μL=0.1 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。