

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：BC0220

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

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

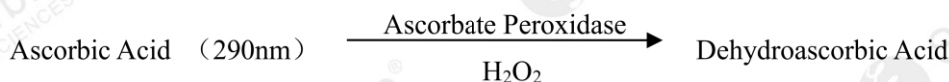
溶液的配制：

- 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。



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。

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 1mL 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 1mL 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。

$$\text{APX 活性(U/mg prot)} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^6 \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T$$
$$= 1.79 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

（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。

$$\text{APX 活性(U/g 质量)} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^6 \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$
$$= 1.79 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

ε：AsA 在 290nm 处摩尔吸光系数，2.8×10³ L/mol/cm；d：1mL 石英比色皿光径，1cm；V 反总：反应体系总体积，1000μL=1×10⁻³L；10⁶：单位换算系数，1mol=1×10⁶μmol；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] Zhao X, Zhang Y, Ma Y, Zhang L, Jiang Y, Liang H, Wang D. Inhibitory mechanism of low-oxygen-storage treatment in postharvest internal bluing of radish (*Raphanus sativus*) roots. Food Chem. 2021 Dec 1; 364:130423. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.130423. Epub 2021 Jun 19. PMID: 34198034.

[2] Zhang Y, Hu Y, Wang Z, Lin X, Li Z, Ren Y, Zhao J. The translocase of the inner mitochondrial membrane 22-2 is required for mitochondrial membrane function during Arabidopsis seed development. J Exp Bot. 2023 Aug 17;74(15):4427-4448. doi: 10.1093/jxb/erad141. PMID: 37105529.

[3] Zhang Z, Zhang Y, Yuan L, Zhou F, Gao Y, Kang Z, Li T, Hu X. Exogenous 5-aminolevulinic acid alleviates low-temperature injury by regulating glutathione metabolism and β-alanine metabolism in tomato seedling roots. Ecotoxicol Environ Saf. 2022 Oct 15; 245:114112. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.114112. Epub 2022 Sep 22. PMID: 36155340.

[4] Wang X, Zhang X, Jia P, Luan H, Qi G, Li H, Guo S. Transcriptomics and metabolomics provide insight into the anti-browning mechanism of selenium in freshly cut apples. Front Plant Sci. 2023 May 8;14:1176936. doi: 10.3389/fpls.2023.1176936. PMID: 37223812; PMCID: PMC10200898.

[5] Lin D, Yan R, Xing M, Liao S, Chen J, Gan Z. Fucoidan treatment alleviates chilling injury in cucumber by regulating ROS homeostasis and energy metabolism. Front Plant Sci. 2022 Dec 23; 13:1107687. doi: 10.3389/fpls.2022.1107687. PMID: 36618644; PMCID: PMC9816408.

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 = $A1_{\text{空白管}} - A2_{\text{空白管}} = 0.668 - 0.659 = 0.009$ ， ΔA 测定管 = $A1_{\text{测定管}} - A2_{\text{测定管}} = 0.958 - 0.824 = 0.134$ ，按样本质量计算酶活得：

APX 活性 (U/g 质量) = $1.79 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W = 1.79 \times (0.134 - 0.009) \div 0.1 = 2.23 \text{ U/g 质量}$ 。

相关系列产品:

BC1230/BC1235 抗坏血酸 (AsA) 含量检测试剂盒

BC1240/BC1245 脱氢抗坏血酸 (DHA) 含量检测试剂盒

BC1260/BC1265 抗坏血酸氧化酶 (AAO) 活性检测试剂盒

BC0650/BC0655 单脱氢抗坏血酸还原酶 (MDHAR) 活性检测试剂盒

