

抗坏血酸过氧化物酶（APX）活性检测试剂盒说明书

微量法

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：BC0225

规格：100T/96S

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 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
粉剂一	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 15 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

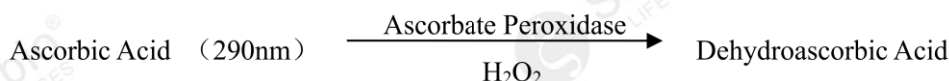
溶液的配制：

- 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 10 mL 蒸馏水充分溶解。4℃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，是植物 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。

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/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔 UV 板、低温离心机、移液枪、水浴锅、研钵/匀浆器、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/酶标仪预热 30min 以上，调节波长到 290nm，分光光度计用蒸馏水调零。
2. 试剂一在 25℃中预热 30min 以上。
3. 操作表：（在微量石英比色皿或 96 孔 UV 板中加入下列试剂）





试剂名称 (μL)	测定管	空白管
样本	20	-
蒸馏水	-	20
试剂一	140	140
试剂二	20	20
试剂三	20	20

将上述试剂依次加入微量石英比色皿/96孔UV板中，迅速混匀，测定290nm处10s及130s的吸光值，记为A1和A2，计算 $\Delta A_{\text{测定管}} = A1_{\text{测定管}} - A2_{\text{测定管}}$ ， $\Delta A_{\text{空白管}} = A1_{\text{空白管}} - A2_{\text{空白管}}$ ，空白管只需做1-2次。

三、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。

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

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：每克样本每分钟氧化1μmol AsA为1个酶活单位。

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

ϵ : AsA在290nm处摩尔吸光系数为 $2.8 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 微量石英比色皿光径, 1cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $200\mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$; 10^6 : 单位换算系数, $1\text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; Cpr : 样本蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定; W : 样本质量, g; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中样本体积, $20\mu\text{L} = 0.02\text{mL}$; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; T : 催化反应时间, 2min。

b.使用96孔UV板测定的计算公式如下

(1) 按蛋白浓度计算

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。

$$\begin{aligned} \text{APX 活性(U/mg prot)} &= (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^6 \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 3 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：每克样本每分钟氧化1μmol AsA为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{APX 活性(U/g 质量)} &= (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^6 \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 3 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W \end{aligned}$$

ϵ : AsA在290nm处摩尔吸光系数为 $2.8 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 96孔UV板光径, 0.6cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $200\mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$; 10^6 : 单位换算系数, $1\text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; Cpr : 样本蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定; W : 样本质量, g; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中样本体积, $20\mu\text{L} = 0.02\text{mL}$; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; T : 催化反应时间, 2min。

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，用微量石英比色皿测得计算 $\Delta A_{\text{空白管}} = A1_{\text{空白管}} - A2_{\text{空白管}} = 0.5453 - 0.5287 = 0.0166$ ， $\Delta A_{\text{测定管}} = A1_{\text{测定管}} - A2_{\text{测定管}} = 0.7097 - 0.6137 = 0.096$ ，按样



本质量计算酶活:

APX 活性 (U/g 质量) = $1.79 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W = 1.79 \times (0.096 - 0.0166) \div 0.1 = 1.421 \text{ U/g 质量}$ 。

相关发表文献:

- [1] Zhao H, Qian R, Liang X, Ou Y, Sun C, Lin X. Indium induces nitro-oxidative stress in roots of wheat (*Triticum aestivum*). *J Hazard Mater*. 2022 Apr 15;428:128260. doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.128260. Epub 2022 Jan 12. PMID: 35038664.
- [2] Yan YF, Wu TL, Du SS, Wu ZR, Hu YM, Zhang ZJ, Zhao WB, Yang CJ, Liu YQ. The Antifungal Mechanism of Isoxanthohumol from *Humulus lupulus* Linn. *Int J Mol Sci*. 2021 Oct 7;22(19):10853. doi: 10.3390/ijms221910853. PMID: 34639194; PMCID: PMC8509189.
- [3] Zou Y, Cao S, Zhao B, Sun Z, Liu L, Ji M. Increase in glutathione S-transferase activity and antioxidant damage ability drive resistance to bensulfuron-methyl in *Sagittaria trifolia*. *Plant Physiol Biochem*. 2022 Nov 1;190:240-247. doi: 10.1016/j.plaphy.2022.09.007. Epub 2022 Sep 15. PMID: 36148723.
- [4] Yuan WJ, He ZY, Zhang SP, Zheng YP, Zhang XQ, He SQ, He YX, Li Y. Comparative transcriptomics provides insights into the pathogenic immune response of brown leaf spots in weeping forsythia. *Tree Physiol*. 2023 Sep 6;43(9):1641-1652. doi: 10.1093/treephys/tpad060. PMID: 37171622.
- [5] Zhang C, Zhou P, Mei J, Xie J. Effects of Different Pre-Cooling Methods on the Shelf Life and Quality of Sweet Corn (*Zea mays* L.). *Plants (Basel)*. 2023 Jun 19;12(12):2370. doi: 10.3390/plants12122370. PMID: 37375995; PMCID: PMC10303236.

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.

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

