

植物抗坏血酸过氧化物酶（APX）检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
PMHA3-C24	抗坏血酸过氧化物酶(APX)试剂盒	24T	常量法
PMHA3-C48		48T	常量法

一、测定意义

抗坏血酸过氧化物酶是植物细胞中防御外界氧化胁迫和植物本身活性氧代谢的重要抗氧化酶类，尤其是叶绿体中清除过氧化氢的关键酶，又是维生素 C 代谢的主要酶类。

二、测定原理

抗坏血酸过氧化物酶（APX）催化抗坏血酸（ASA）与过氧化氢（H₂O₂）反应，使ASA氧化成单脱氢抗坏血酸（MDASA）。通过测定抗坏血酸（ASA）在290nm波长下的吸光度值（A₂₉₀）下降，根据单位时间内A₂₉₀减少值，计算抗坏血酸过氧化物酶（APX）活性。

三、试剂组成

试剂名称	试剂装量（24T）	试剂装量（48T）	保存条件
提取液	液体 30mL×1 瓶	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂一	液体 30mL×1 瓶	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂二	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	4℃ 保存
试剂二配制： 临用前一瓶加入 5mL 蒸馏水充分溶解，现有现配。			
试剂三	2.5mL×1 瓶	5mL×1 瓶	4℃ 保存

四、操作步骤

样本前处理

植物组织提取液的制备：取一定量植物组织擦净水分及杂质，剪碎后放入研钵，加入液氮，研磨成粉状后转移出来，然后准确称重，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），旋涡混匀抽提 3-5 分钟或者使用组织破碎仪冰浴提取，8000g，4℃ 离心 10min，取上清液置冰上待测。

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、试剂回复至常温；
- 3、操作表：

试剂	空白管	测定管

双蒸水 (μl)	100	
样本 (μl)		100
试剂一 (μl)	700	700
试剂二 (μl)	100	100
试剂三 (μl)	100	100
迅速混匀，双蒸水调零，波长 290nm，1cm 光径石英比色皿，室温下 (25℃) 分别测定 10s 和 130s 吸光度值 A1 和 A2， $\Delta A = A1 - A2$		

五、植物样本中抗坏血酸过氧化物酶计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每毫克蛋白每分钟氧化 1μmol ASA 为 1 个酶活单位。

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

ε: ASA 在 290nm 处摩尔吸光系数， $2.8 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$;

d: 比色皿光径，1cm;

$V_{\text{反应}}$: 反应体系总体积， $1000\mu\text{L} = 1 \times 10^{-3} \text{L}$;

10^6 : 单位换算系数， $1 \text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$;

Cpr: 上清液蛋白质浓度 (mg/mL) ;

$V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积， $100\mu\text{L} = 0.1 \text{mL}$;

T: 催化反应时间 (min) , 2min。

(2) 按样本质量计算

单位定义：每 g 组织每分钟氧化 1μmol ASA 为 1 个酶活单位。

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

ε: ASA 在 290nm 处摩尔吸光系数， $2.8 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$;

d: 比色皿光径，1cm;

$V_{\text{反应}}$: 反应体系总体积， $1000\mu\text{L} = 1 \times 10^{-3} \text{L}$;

10^6 : 单位换算系数， $1 \text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$;

W, 样本质量, g ;

$V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积， $100\mu\text{L} = 0.1 \text{mL}$;

T: 催化反应时间 (min) , 2min。

六、计算举例

取一定量的新鲜牧草叶片，液氮研磨后，准确称取 0.1g 粉末，加入 1mL 提取液，混匀抽提 3 分钟提取，8000g，4℃离心 10min，制备粗酶液，按照操作步骤操作。测得测定管 A₁ 为 1.2713 和 A₂ 为 1.0373，空白管 A₁ 为 0.8011 和 A₂ 为 0.7826，将测得数据带入计算公式中：

$$\text{APX(U/g 质量)} = 1.79 \times ((1.271 - 1.037) - (0.801 - 0.782)) \div 0.1 = 3.85 \text{ U/g}$$

七、注意事项

- 1) 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。
- 2、 $\Delta A_{\text{测定管}}$ 若是高于 0.3 或者反应液中有较多气泡产生，可将样本用提取液进行稀释。计算时乘以相应的稀释倍数即可。
- 3、仪器读数一直跳动时，需等稳定后才能准确记录相关数据。

八、公司介绍

陌凡生物科技有限公司是一家专业从事转基因检测、食品安全以及动植物疫病检测为核心业务的生物科技公司。能够为客户提供动植物疫病检测试剂、小分子抗原抗体、植物激素、植物抗体、重组蛋白等优质产品。自主研发了涵盖分子生物学、细胞生物学、免疫学、生物医学等领域的各种试剂盒。产品覆盖面广，品质可靠。