

抗坏血酸过氧化物酶(APX)试剂盒

- 【产品简介】**
- ◆抗坏血酸过氧化物酶(APX;EC1. 11. 1. 11)也称维生素C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,在降低H₂O₂对植物细胞产生氧化损伤方面起关键作用。
 - ◆抗坏血酸过氧化物酶(APX)首先与H₂O₂形成中间复合物,中间复合物接着氧化AsA,因此APX与AsA具有一定的负相关性,通过测定AsA氧化速率,来计算 APX酶活性。

【货 号】 TC1015

【规 格】 96T

【包装清单】

试剂名称	规格	保存条件	备注
提取液	液体120mL×1瓶	4℃	
试剂一	液体20mL×1瓶	4℃	
试剂二	粉剂 mg×3支	4℃	用前甩几下或4℃离心使试剂落入试管底部,每支再加1.5 mL蒸馏水充分溶解,用不完的试剂分装后-20℃保存(可保存一个月),禁止反复冻融,解冻后可4℃保存并一周内使用完。
试剂三	液体2.5mL×1瓶	4℃	

【保存条件】 4℃保存,有效期一年。

【操作步骤】 1、样本制备:

①组织样本:

称取约0.1g组织(水分充足的样本可取0.5g),加入1mL提取液,进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃离心10min,取上清置冰上待测。

注意:若样本颜色较深(如植物叶片),可引起起始值A1值较大如超过2,可在样本制备过程中增加除色素步骤:取约0.2g组织(水分充足的样本可取1g),加入90%乙醇冰浴匀浆,12000rpm, 4℃离心10min,弃掉色素较深的上清液;以上除色素步骤重复2次。最后向离心得到的沉淀中加入1mL提取液,混匀或再次冰浴匀浆,12000rpm, 4℃离心10min,取上清置冰上待测。

②细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;取500万细菌或细胞加入1mL

提取液，在4℃或冰浴进行匀浆(或使用各类常见电动匀浆器)。4℃约12,000rpm离心10min, 取上清待测。

注:若增加样本量,可按照细菌细胞数量(10^4):提取液mL)为500-1000:1的比例进行提取。

2、上机检测:

①酶标仪预热30 min以上, 调节波长到290nm, 设定震荡时间5s。

②试剂一放25℃水浴中预热30min(如果实验室温度达到25℃以上, 可以静置30min)

③试剂一和二可按照140:20比例配成混合液(一枪加160uL该混合液)(该混合液用多少配多少, 现配现用), 试剂三需单独加。

④依次在96孔板中加入:

试剂名称(uL)	测定管
样本	20
试剂一	140
试剂二	20
试剂三	20
混匀, 25℃条件下, 在290nm处, 分别于30s和5min 30s处读取吸光值A, 相应记为 A1和 A2, $\Delta A=A1-A2$ 。	

3、结果计算:

①按样本蛋白浓度计算:

酶活定义:25℃条件下, 每毫克蛋白每分钟氧化1 μmol 的 AsA为1个酶活单位。

$$\text{APX}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mgprot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \\ = 1.43 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

②按样本质量计算:

酶活定义:25℃条件下, 每克组织每分钟氧化1 μmol 的AsA为1个酶活单位。

$$\text{APX}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ = 1.43 \times \Delta A \div W$$

3、按细胞数量计算:

酶活定义:25℃条件下, 每10个细胞每分钟氧化1nmol的AsA为1个酶活单位

$$\text{APX}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ = 1429 \times \Delta A \div 500$$

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

d ---96孔板光径(cm), 0.5cm; 10^6 ---1mol= $1 \times 10^6 \mu\text{mol}$;

W ---样品质量, g; 500 ---细胞数量, 万;

V ---提取液体积, 1 mL;

V1---加入反应体系中上清液体积(mL)，20uL=0.02mL；

V2--反应体系总体积(L)，200uL= 2×10^{-4} L；

T--催化反应时间(min)，5min；

Cpr--蛋白浓度(mg/ml)

- 【注意事项】**
- 1、本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。
 - 2、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
-