抗坏血酸过氧化物酶（APX）活性检测试剂盒说明书

规格：96 样　　方法：酶标仪法

一、注意事项

1. 使用前请通读一遍说明书再开始实验。
2. 正式检测前选取 2~3 个样本进行预检测。
3. 本试剂盒仅用于科研。
4. 准备 96 孔 UV 板一块（非普通酶标板，普通酶标板只能透过可见光，不能透过紫外光，检测波长小于 340 nm 务必使用 UV 板）。

二、产品组分

试剂名称	试剂规格	保存条件	备注
试剂一	120 mL×1	4℃	
试剂二	粉剂×2	4℃	临用前加 3 mL 蒸馏水充分溶解（溶解后 4℃保存，3 天内用完）。
试剂三	3 mL×1	4℃	

三、仪器和用品

酶标仪、96 孔板（UV 板）、移液器、天平、可降温离心机、超纯水/蒸馏水、研磨仪/研钵、冰、水浴锅。

四、样品制备

1. 按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1 mL 试剂一）进行冰浴匀浆。13000 g，4℃离心 20 min，置冰上，上清为待测样本。

五、测定步骤

1. 酶标仪预热 30 min 以上，波长调至 290 nm 处。
2. 试剂一在 25℃中预热 30 min。
3. 在 96 孔 UV 板中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	空白管
上清液	20	-
超纯水/蒸馏水	-	20
试剂一	140	140

试剂二	20	20
试剂三	20	20
迅速混匀后，分别在 290 nm 测定 10 s 和 130 s 光吸收 A1 测定和 A2 测定，以及 A1 空白和 A2 空白；ΔA 测定=A1 测定-A2 测定，ΔA 空白=A1 空白-A2 空白，ΔA=Δ测定 A-ΔA 空白。		

六、计算

1. 按样本质量计算

活性单位定义：每 g 组织每分钟氧化 1 nmol AsA 为 1 个酶活单位。

抗坏血酸过氧化物酶（nmol/min/g 鲜重）=ΔA÷（ε×d）×V 反总×10^9÷（W×V 样÷V 样总）÷T=2975.83×ΔA÷W

2. 按照蛋白浓度计算

活性单位定义：每毫克蛋白每分钟氧化 1 nmol AsA 为 1 个酶活单位。

抗坏血酸过氧化物酶（nmol/min/mg prot）=ΔA÷（ε×d）×V 反总×10^9÷（Cpr×V 样）÷T=2975.83×ΔA÷Cpr

ε：AsA 在 290 nm 处摩尔吸光系数为 2.8×10^3 L/mol/cm；d：96 孔板光径（cm），0.6 cm；V 反总：反应体系总体积（L），200 μL=2×10^{-4}L；10^9：1 mol=1×10^9 nmol；Cpr：上清液蛋白质浓度（mg/mL），需要另外测定；W：样品质量；V 样：加入反应体系中上清液体积（mL），20 μL=0.02 mL；V 样总：提取液体积，1 mL；T：催化反应时间（min），2 min。

七、产品简介

抗坏血酸过氧化物酶（APX）是植物清除过氧化氢的关键酶，催化抗坏血酸还原 H_2O_2生成水，广泛存在于叶绿体和细胞质中。主要功能是保护细胞免受氧化损伤，在植物抗逆响应中发挥重要作用，是评价植物抗氧化能力的重要指标。