（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!）

产品货号：E-BC-K353-S

产品规格：50 assays(48 samples)/ 100 assays(96 samples)

检测仪器：紫外-可见光分光光度计（290 nm）

Elabscience®抗坏血酸过氧化物酶（APX）比色法测试盒

Ascorbate Peroxidase (APX) Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100
邮箱：biochemical@elabscience.cn
网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测植物组织中抗坏血酸过氧化物酶活力。

检测原理

抗坏血酸过氧化物酶（APX）催化抗坏血酸（ASA）与过氧化氢（H_2O_2）反应，使 ASA 氧化成单脱氢抗坏血酸（MDASA）。随着 ASA 被氧化，溶液中 290 nm 波长下吸光度值（A_{290}）下降，根据单位时间内 A_{290} 减少值，计算抗坏血酸过氧化物酶（APX）活性。ASA 氧化量按消光系数 2.8 mL/(μmol•cm)计算。

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用考马斯亮蓝法（货号：E-BC-K168-M）。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1(Size 1) (50 assays)	规格 2(Size 2) (100 assays)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extracting Solution)	60 mL×1 瓶	60 mL×2 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 (Buffer Solution)	40 mL×1 瓶	40 mL×2 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 (Substrate)	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	基质液 (Substrate Solution)	12 mL×1 瓶	12 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：紫外-可见光分光光度计（290 nm）、恒温培养箱（37℃）、涡旋混匀仪

耗材：吸水纸、擦镜纸

试剂：双蒸水或去离子水、生理盐水（0.9% NaCl）或 PBS（0.01 M，pH 7.4）

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 试剂三应用液的配制：

临用前将试剂三粉剂加入6 mL双蒸水溶解，混匀，2-8℃避光保存3天。

样本准备

① 样本处理

取 0.020-1.0 g 新鲜组织块，用双蒸水漂洗，滤纸擦干，称重，放入匀浆容器中，按照重量（g）：体积（mL）=1: 9 的比例加入 2-8℃的试剂一，进行匀浆，4℃，10000 × g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，结合本试剂盒的检测范围（0.07-47 U/g组织），选取最佳稀释倍数，进行正式批量实验。不同样本的稀释比例范围如下表（仅供参考）：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%绿萝匀浆	不稀释	10%青椒匀浆	不稀释
10%胡萝卜匀浆	不稀释	10%香菇匀浆	不稀释

注：稀释液为生理盐水（0.9% NaCl）或 PBS（0.01 M，pH 7.4）。

实验关键点

① 严格控制反应时间。

② 检测前必须将试剂二 37℃预热 1 h。

③ 若 A_0 大于 2.0，需要将样本稀释后进行检测。

操作步骤

① 检测之前，将试剂二 37℃预热 1 h。

② 将分光光度计预热 30 min，波长调节 290 nm，双蒸水调零。

③ 空白管：取 0.1 mL 的试剂一，加入 2 mL EP 管中；
测定管：取 0.1 mL 的待测样本，加入 2 mL EP 管中。

④ 向步骤③各管中，依次加入 0.7 mL 试剂二、0.1 mL 试剂三应用液。

⑤ 向步骤④各管中，加入 0.1 mL 试剂四，立刻计时，迅速混匀（涡旋混匀），将反应液倒入 1 mL 石英比色皿中，测定 15 s 时吸光度值为 A_0。37℃温育，测定 135 s 时吸光度值为 A_1。

操作表

	空白管	测定管
试剂一（mL）	0.1	--
待测样本（mL）	--	0.1
试剂二（mL）	0.7	0.7
试剂三应用液（mL）	0.1	0.1
试剂四（mL）	0.1	0.1
双蒸水调零，290 nm 波长，1 mL 石英比色皿，测定 15 s 时吸光度值 A_0，37℃温育，测定 135 s 时吸光度值 A_1。		

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用考马斯亮蓝法(货号 E-BC-K168-M)进行测定。

结果计算

按样本蛋白浓度计算：

定义：在 37℃条件下，每毫克组织蛋白每分钟在每 mL 反应体系中催化 1 μmol ASA 为一个酶活力单位。

$$\text{APX 活性 (U/mgprot)} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times 1} \times \frac{V_1}{V_3 \times C_{pr}} \times f \div t$$

按样本质量计算：

定义：在 37℃条件下，每克组织每分钟在每 mL 反应体系中催化 1 μmol ASA 为 1 个活力单位（U）。

$$\text{APX 活性 (U/g 组织)} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times 1} \times \frac{V_1 \times V_2}{V_3 \times m \times t} \times f$$

注解：

ΔA：样本的绝对 OD 值（$\Delta A_{测定}$-$\Delta A_{空白}$）（$\Delta A_{测定} = A_{测0} - A_{测1}$，$\Delta A_{空白} = A_{空0} - A_{空1}$）

ε：ASA 在 290nm 处摩尔吸光系数为 2.8 mL/（μmol•cm）

l：比色皿光径（1 cm）

V_1：反应体系总体积（1 mL）

V_2：匀浆介质体积（1 mL）

V_3：加入反应体系中样本体积（0.1 mL）

C_{pr}：待测样本的蛋白浓度（mgprot/mL）

m：样本鲜重（g）

t：反应时间（2 min）

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	0.071-47 U/g 组织	**平均批间差**	6.4 %
灵敏度	0.071 U/g 组织	**平均批内差**	4.8 %
平均回收率	96 %		

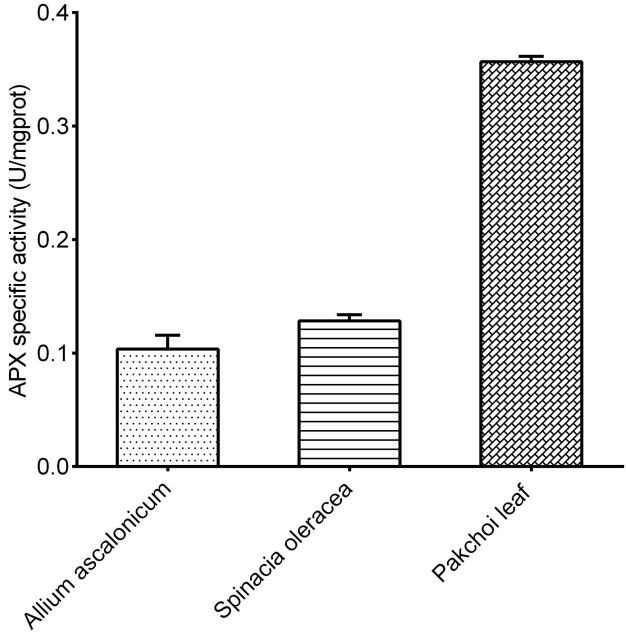
附录2 实例分析

例如检测菠菜叶组织(数据仅供参考)：

10%的菠菜叶组织匀浆：准确称量0.10 g菠菜叶组织加入0.9 mL试剂一，冰水浴条件下机械匀浆，4℃，10000 × g离心10 min，取上清0.1 mL，按说明书操作，结果如下：空白的△A为0.012，菠菜叶的△A为0.314，同时测得蛋白浓度为4.20 mgprot/mL，计算结果为：

$$\text{APX 活力（U/mgprot）} = \frac{0.314-0.012}{2.8\times1} \times \frac{1}{0.1 \times 4.2} \times 1 \div 2 = 0.13 \text{ U/mgprot}$$

按照说明书操作，测定香葱叶（10%组织匀浆的蛋白含量2.88 mg/mL，加样量0.1 mL）、菠菜叶（10%组织匀浆的蛋白含量4.20 mg/mL，加样量0.1 mL）和小白菜叶（10%组织匀浆的蛋白含量6.41 mg/mL，加样量0.1 mL）中APX活力（如下图）：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
复孔差异大	未严格按照说明书操作	严格按照说明书操作
样本值偏低	试剂二未预热	将试剂二预热后使用
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数,重新检测
读数数值低	用不恰当波长检测	选择正确的检测波长

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Zhang X, He C, Chen Y, et al. Cyclic reactions-mediated self-supply of H2O2 and O2 for cooperative chemodynamic/starvation cancer therapy[J]. Biomaterials, 2021, 275:120987-. IF:12.479
2. Liu Q, Zhang T X, Zheng Y D, et al. Calixarene-Embedded Nanoparticles for Interference-Free Gene–Drug Combination Cancer Therapy[J]. Small, 2021, 2006223. IF:11.459
3. He C, Zhang X, Chen C, et al. A solid lipid coated calcium peroxide nanocarrier enables combined cancer chemo/chemodynamic therapy with O2/H2O2 self-sufficiency[J]. Acta Biomaterialia, 2021, 122. IF:8.203
4. Omar N, Frank J, Kruger J, et al. Effects of High Intakes of Fructose and Galactose, with or Without Added Fructooligosaccharides, on Metabolic Factors, Inflammation, and Gut Integrity in a Rat Model[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2021:2001133. IF:5.914
5. Yu H, Zhang L, Chen P, et al. Dietary bile acids enhance growth, and alleviate hepatic fibrosis induced by a high starch diet via AKT/FOXO1 and cAMP/AMPK/SREBP1 pathway in Micropterus salmoides[J]. Frontiers in Physiology, 2019, 10. IF:3.367
6. Chang X, Zhang P, Xu X X, et al. Total Glucosides of Paeony Inhibited Autophagy and Improved Acute Kidney Injury Induced by Ischemia-Reperfusion via the lncRNA TUG1/miR-29a/PTEN Axis[J]. Dove Press, 2021. IF:3.349
7. Al-Kuraishy H M, Al-Gareeb A I, Al-Naimi M S. Renoprotective effect of irbesartan in a rat model of gentamicin-induced nephrotoxicity: Role of oxidative stress[J]. Journal of laboratory physicians, 2019, 11(3): 200.