

硫氧还蛋白过氧化物酶 (Thioredoxin peroxidase) 试剂盒说明书

(货号: G0217F 分光法 48 样)

一、产品简介:

硫氧还蛋白过氧化物酶 (TPx) 属于过氧化物酶家族, 普遍存在于各种生物体内, 主要还原过氧化氢和一些氢过氧化物来实现抗氧化作用, 功能与 GPX 类似, 也是谷胱甘肽氧化还原循环关键酶之一。具有抗氧化和调节由过氧化氢介导的信号转导和免疫反应等功能。

本试剂盒利用 TPX 催化 H_2O_2 氧化二硫苏糖醇 (DTT), 通过用硫氰酸铁法检测剩余 H_2O_2 , 由于形成的化合物于 475nm 处的吸光值, 进而计算出 TPX 活性大小。

二、试剂盒组分与配制

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉体 mg×3 支	4°C 保存	使用前甩几下使试剂落入底部, 每支加 2mL 蒸馏水溶解, 三天内用完。
试剂三	液体 mL×1 支	4°C 保存	使用前甩几下使试剂落入底部, 取 11μL 至新 EP 管中, 再加 1.1mL 蒸馏水混匀, 接着再用蒸馏水稀释 100 倍备用。
试剂四	3mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂五	粉体 mg×4 支	4°C 保存	使用前甩几下使试剂落入底部, 每支加 1.5mL 蒸馏水溶解, 现配现用。
试剂六	2.5mL×1 支	4°C 保存	

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、低温离心机、移液器、研钵、冰。

四、硫氧还蛋白过氧化物酶 (TPx) 活性测定:

1、样本制备:

- ① 组织样本: 称取约 0.1g 组织 (水分充足样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 在 4°C 或冰浴进行匀浆。4°C 约 12,000rpm 离心 10min, 取上清作为待测样品。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取

- 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°C 或冰浴进行匀浆。4°C 约 12,000rpm 离心 10min, 取上清作为待测样品。

【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。

- ③ 液体样本: 直接测定。

2、上机检测:

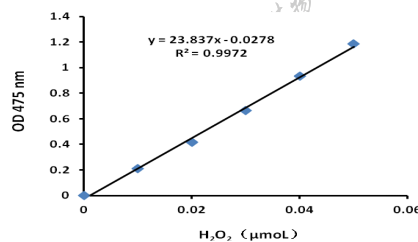
- ① 可见分光光度计预热 30 min, 调节波长到 475nm, 蒸馏水调零。
② 所有试剂解冻至室温 (25°C), 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
样本	20	
蒸馏水		20
试剂一	330	330
试剂二	100	100

混匀，室温（25℃）孵育 5min		
试剂三	50	50
混匀，室温（25℃）反应 2min		
试剂四	50	50
试剂五	100	100
试剂六	50	50
混匀，测定管需室温（25℃）12000rpm 离心 2min，再同空白管一起取全部澄清液体至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，立即于 475nm 处读值， $\Delta A = A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}$ 。		

五、结果计算：

1. 标准曲线： $y = 23.837x - 0.0278$ 。x 是 H_2O_2 摩尔质量（ μmol ），y 为吸光值 ΔA 。



2. 按蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克蛋白每分钟降解 $1\mu\text{molH}_2\text{O}_2$ 为 1 个酶活单位。

$$\text{TPx 酶活 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0278) \div 23.837] \div (\text{Cpr} \times \text{V1}) \div \text{T} \times \text{D} \\ = 1.05 \times (\Delta A + 0.0278) \div \text{Cpr} \times \text{D}$$

3. 按样本质量计算：

酶活定义：每克样本每分钟氧化降解 $1\mu\text{molH}_2\text{O}_2$ 为 1 个酶活单位。

$$\text{TPx 酶活 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0278) \div 23.837] \div (\text{W} \times \text{V1} \div \text{V}) \div \text{T} \times \text{D} \\ = 1.05 \times (\Delta A + 0.0278) \div \text{W} \times \text{D}$$

4. 按细胞数量计算：

酶活定义：每 10^4 个细胞每分钟降解 $1\mu\text{molH}_2\text{O}_2$ 为 1 个酶活单位。

$$\text{TPx 酶活 } (\mu\text{mol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0278) \div 23.837] \div (\text{细胞数量} \times \text{V1} \div \text{V}) \div \text{T} \times \text{D} \\ = 1.05 \times (\Delta A + 0.0278) \div \text{细胞数量} \times \text{D}$$

5. 按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟降解 $1\mu\text{molH}_2\text{O}_2$ 为 1 个酶活单位。

$$\text{TPx 酶活 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0278) \div 23.837] \div \text{V1} \div \text{T} \times \text{D} = 1.05 \times (\Delta A + 0.0278) \times \text{D}$$

V---提取液体积，1 mL；

V1---上清液体积， $20\mu\text{L} = 0.02 \text{ mL}$ ；

D---稀释倍数；

W---样本质量，g；

T---反应时间，2min；

Cpr---上清液蛋白浓度（mg/mL）；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 标准品母液（ $1\mu\text{mol}/\text{mL}$ ）：即稀释 100 倍后备用的试剂三。
- 2 把母液稀释成六个梯度：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, $1\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。
- 3 在 EP 管依次加入： $20\mu\text{L}$ 蒸馏水+ $430\mu\text{L}$ 试剂一+ $50\mu\text{L}$ 标准品+ $50\mu\text{L}$ 试剂四+ $100\mu\text{L}$ 试剂五+ $50\mu\text{L}$ 试剂六，混匀取澄清液体至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，立即于 475nm 处读值，依据结果即可制作标准曲线。