

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

(货号: ADS-W-G004 微板法 96 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 100mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 35mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉体 3 支	4°C 保存	使用前甩几下使试剂落入底部, 每支加 4mL 蒸馏水溶解, 三天内用完。
试剂三	液体 1 支	4°C 保存	使用前甩几下使试剂落入底部, 取 11 μ L 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	5mL×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 3mL 蒸馏水溶解, 现配现用。
试剂六	5mL×1 瓶	4°C 保存	

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、低温离心机、移液器、研钵、冰和蒸馏水。

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 酶标仪预热 30 min, 调节波长到 475 nm。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C), 在 EP 管中依次加入:

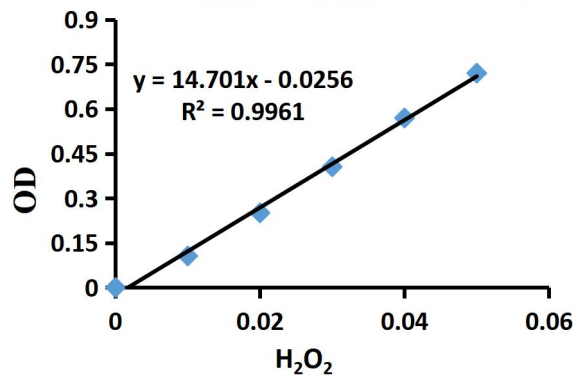
试剂名称 (μ L)	测定管	空白管 (仅做一次)
样本	20	
蒸馏水		20
试剂一	330	330
试剂二	100	100

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 5min，再同空白管一起取 200μL 澄清液体至 96 孔板中，立即于 475nm 处读值， $\Delta A = A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}$ 。		

【注】若测定管没有颜色即 TPx 活性高，需减少样本加样体积 V1(如减至 5μL，则试剂一相应增加)，或缩短反应时间 T(如室温反应 2min 缩至 1min 或更短)；若 ΔA 在零附近即测定管颜色接近空白管，需增加加样体积 V1(如增至 40μL，则试剂一相应减少)，或延长反应时间 T(如延至 5min 或更长)；则改变后的 V1 和 T 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1. 标准曲线： $y = 14.701x - 0.0256$ 。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 $1\mu\text{mol}H_2O_2$ 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{TPx 酶活 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0256) \div 14.701] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \times D \\ &= 1.7 \times (\Delta A + 0.0256) \div \text{Cpr} \times D \end{aligned}$$

3. 按样本质量计算：

酶活定义：每克样本每分钟氧化降解 $1\mu\text{mol}H_2O_2$ 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{TPx 酶活 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0256) \div 14.701] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 1.7 \times (\Delta A + 0.0256) \div W \times D \end{aligned}$$

4. 按细胞数量计算：

酶活定义：每 10^4 个细胞每分钟降解 $1\mu\text{mol}H_2O_2$ 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{TPx 酶活 } (\mu\text{mol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0256) \div 14.701] \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 1.7 \times (\Delta A + 0.0256) \div \text{细胞数量} \times D \end{aligned}$$

5. 按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟降解 $1\mu\text{mol}H_2O_2$ 为 1 个酶活单位。

$$\text{TPx 酶活 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0256) \div 14.701] \div V1 \div T \times D = 1.7 \times (\Delta A + 0.0256) \times D$$

V---提取液体积，1 mL； V1---上清液体积，20μL=0.02 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 μ mol/mL。
- 3 在 EP 管依次加入：20 μ L 蒸馏水+430 μ L 试剂一+50 μ L 标准品+50 μ L 试剂四+100 μ L 试剂五+50 μ L 试剂六，混匀取 200 μ L 澄清液体至 96 孔板，立即于 475nm 处读值，依据结果即可制作标准曲线。

