

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

(货号: ADS-F-G004-48 分光法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
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 3 支	4°C 保存	每支: 1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 2mL 蒸馏水溶解, 三天内用完。
试剂三	液体 1 支	4°C 避光保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 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; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	3mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂五	粉体 4 支	4°C 保存	每支: 1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加 1.5mL 蒸馏水溶解, 现配现用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂六	2.5mL×1 瓶	4°C 保存	

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

1、样本提取:

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、检测步骤：

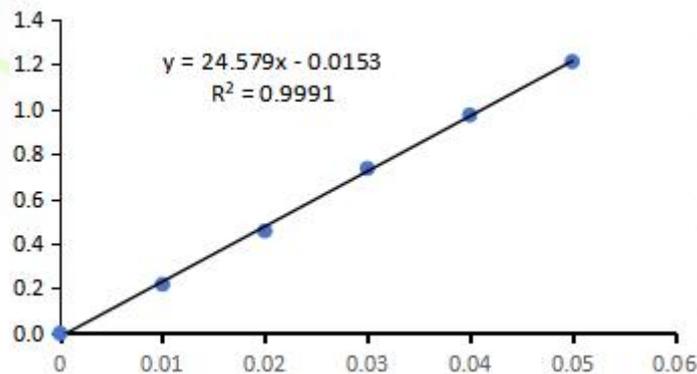
- ① 可见分光光度计预热 30 min，调节波长到 475nm，蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃），在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (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， $\Delta A = A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}$ 。		

【注】若测定管没有颜色即 TPx 活性高，需减少样本加样体积 V_1 (如减至 $5\mu\text{L}$ ，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 V_1 (如增至 $40\mu\text{L}$ ，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 V_1 和 T 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1. 标准曲线： $y = 24.579x - 0.0153$ 。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。

$$\begin{aligned} \text{TPx 酶活 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0153) \div 24.579] \div (\text{Cpr} \times V_1) \div T \times D \\ &= 1.017 \times (\Delta A + 0.0153) \div \text{Cpr} \times D \end{aligned}$$

3. 按样本质量计算：

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

$$\begin{aligned} \text{TPx 酶活 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0153) \div 24.579] \div (W \times V_1 \div V) \div T \times D \\ &= 1.017 \times (\Delta A + 0.0153) \div W \times D \end{aligned}$$

4. 按细胞数量计算：

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

$$\text{TPx 酶活}(\mu\text{mol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[(\Delta A+0.0153)\div 24.579]\div(\text{细胞数量}\times V1\div V)\div T\times D$$

$$=1.017\times(\Delta A+0.0153)\div \text{细胞数量}\times D$$

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。

$$\text{TPx 酶活}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL})=[(\Delta A+0.0153)\div 24.579]\div V1\div T\times D=1.017\times(\Delta A+0.0153)\times D$$

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 将试剂三稀释 100 倍即为标准品母液, 标准品母液浓度为 $1\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, $1\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下:

标品浓度 $\mu\text{mol}/\text{mL}$	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0

各标准管混匀待用。

3 依据加样表操作, 根据结果, 以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值, 过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
蒸馏水	20	70
试剂一	430	430
标品	50	
试剂四	50	50
试剂五	100	100
试剂六	50	50

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, $\Delta A=A$ 测定-0 浓度管。