

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 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 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 35mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 3 瓶	4℃保存	每瓶： 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 4mL 蒸馏水溶解，三天内用完。
试剂三	液体 1 支	4℃避光保存	1. 临用前 8000g 4℃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	5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉体 mg×4 瓶	4℃保存	每瓶： 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 3mL 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	5mL×1 瓶	4℃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）、96 孔板、离心管、酶标仪、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℃ 或冰浴进行匀浆。4℃ 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℃ 或冰浴进行匀浆。4℃ 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：

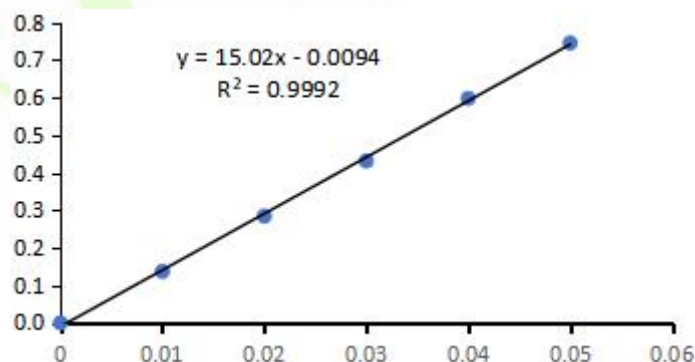
- ① 酶标仪预热 30 min，调节波长到 475 nm。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃），在 EP 管中依次加入：

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 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： $y = 15.02x - 0.0094$ 。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 1μmol H_2O_2 为 1 个酶活单位。

$$\text{TPx 酶活 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0094) \div 15.02] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \times D \\ = 1.7 \times (\Delta A + 0.0094) \div \text{Cpr} \times D$$

3. 按样本质量计算：

酶活定义：每克样本每分钟氧化降解 1μmol H_2O_2 为 1 个酶活单位。

$$\text{TPx 酶活 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0094) \div 15.02] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ = 1.7 \times (\Delta A + 0.0094) \div W \times D$$

4. 按细胞数量计算：

酶活定义：每 10^4 个细胞每分钟降解 1μmol H_2O_2 为 1 个酶活单位。

$$\text{TPx 酶活 } (\mu\text{mol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0094) \div 15.02] \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$=1.7 \times (\Delta A + 0.0094) \div \text{细胞数量} \times D$$

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。

$$\text{TPx 酶活}(\mu\text{mol/min/mL}) = [(\Delta A + 0.0094) \div 15.02] \div V1 \div T \times D = 1.7 \times (\Delta A + 0.0094) \times D$$

V---提取液体积，1 mL； V1---上清液体积，20 μL = 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 将试剂三稀释 100 倍即为标准品母液，标准品母液浓度为 $1\mu\text{mol/mL}$ 。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, $1\mu\text{mol/mL}$ 。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 $\mu\text{mol/mL}$	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 200 μL 澄清液体至 96 孔板，立即于 475nm 处读值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - 0 \text{ 浓度管}$ 。		