

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0605

Size: 50T/48S

硫氧还蛋白过氧化物酶 (TPX) 检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

TPX属于过氧化物酶家族,在体内主要通过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。TPX普遍存在于各种生物体内,如酵母、植物、动物、原生动物、寄生虫、细菌和古细菌,在进化上高度保守。TPX与细胞增殖、分化、细胞凋亡及肿瘤发生调控密切相关。TPX的主要功能包括细胞脱毒、抗氧化和调节由过氧化氢介导的信号转导和免疫反应。

二、测定原理:

TPX催化 H_2O_2 氧化二硫苏糖醇(DTT), H_2O_2 的吸收波长为240nm,通过测定240nm吸光度的下降速率,通过对照减去过氧化氢酶(CAT)催化分解的 H_2O_2 ,即可计算出TPX活性。因此,本试剂盒可以同时测定样品TPX和CAT活性。

三、需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计、低温离心机、水浴锅、可调节移液器、1mL石英比色皿和蒸馏水

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体×1 瓶	室温保存	
试剂二	液体×1 瓶	- 20°C保存	
试剂三	液体×1 瓶	4°C	

五、粗酶液提取:

1. 组织：按照组织质量 (g) : 试剂一体积 (mL) 为 1: 5~10的比例 (建议称取约 0.1g组织, 加入1mL试剂一) 进行冰浴匀浆。8000g, 4°C离心 10min, 取上清置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量 (10⁴个) : 试剂一体积 (mL) 为 500~1000: 1的比例 (建议500万细胞加入1mL试剂一), 冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w, 超声3秒, 间隔7秒, 总时间 3min); 然后 8000g, 4°C, 离心10min, 取上清置于冰上待测。
3. 血清等液体：直接测定。

六、TPX测定操作：

1. 分光光度计预热30min, 调节波长到240nm, 蒸馏水调零。
2. 试剂一和试剂二置于 25°C (一般物种) 或者 37°C (哺乳动物) 水浴预热 30 min。
3. CAT活性测定管：取1mL石英比色皿, 加入20 μL上清液, 900 μL试剂一, 80 μL试剂三, 迅速混匀后于240nm 测定10s和130s吸光度, 记为A1和A2。
4. 总活性测定管：取1mL石英比色皿, 加入20 μL上清液, 900 μL试剂二, 80 μL试剂三, 迅速混匀后于240nm测定10s和130s吸光度, 记为A3和A4。

注意：每个样品都需要做对照管, 以减去过氧化氢酶 (CAT) 催化降解的H₂O₂。

七、TPX活性计算公式：

(1) 按蛋白浓度计算

活性单位定义：25°C或者37°C中, 每毫克蛋白每分钟催化1nmol H₂O₂降解为1个酶活单位。

$$\text{CAT活性 (nmol/min /mg prot)} = (A1 - A2) \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T$$

$$= 573 \times (A1 - A2) \div C_{\text{pr}}$$

$$\text{总活性 (nmol/min /mg prot)} = (A3 - A4) \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T$$

$$= 573 \times (A3 - A4) \div C_{\text{pr}}$$

$$\text{TPX 活性 (nmol/min /mg prot)} = \text{总活性} - \text{CAT 活性}$$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：25°C或者37°C中，每克样本每分钟催化 1nmol H₂O₂降解为1个酶活单位。

$$\text{CAT 活性 (nmol/min/g)} = (A1 - A2) \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 573 \times (A1 - A2) \div W$$

$$\text{总活性 (nmol/min/g)} = (A3 - A4) \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 573 \times (A3 - A4) \div W$$

$$\text{TPX 活性 (nmol/min /g)} = \text{总活性} - \text{CAT 活性}$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：25°C或者37°C中，每10⁴个细胞每分钟催化 1nmol H₂O₂降解为1个酶活单位。

$$\text{CAT活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = (A1 - A2) \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 573 \times (A1 - A2) \div \text{细胞数量}$$

$$\text{总活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = (A3 - A4) \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 573 \times (A3 - A4) \div \text{细胞数量}$$

$$\text{TPX 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = \text{总活性} - \text{CAT 活性}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：25°C或者 37°C中，每毫升液体每分钟催化 1nmol H₂O₂降解为1个酶活单位。

$$\text{CAT 活性 (nmol/min /mL)} = (A1 - A2) \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 573 \times (A1 - A2)$$

$$\text{总活性 (nmol/min /mL)} = (A3 - A4) \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 573 \times (A3 - A4)$$

$$\text{TPX 活性 (nmol/min /mL)} = \text{总活性} - \text{CAT 活性}$$

ε : H₂O₂的摩尔消光系数, 43600 L/mol/cm=0.0436 L/μmol/cm; d: 比色皿光径, 1cm;
V 反总: 反应体系总体积 (L), 1000 μL=0.001L; Cpr: 上清液蛋白质浓度 (mg/mL); V 样:

加入反应体系中上清液体积 (mL) , 20 μ L=0.02 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; W, 样本质量, g; T: 反应时间 (min) , 2min。