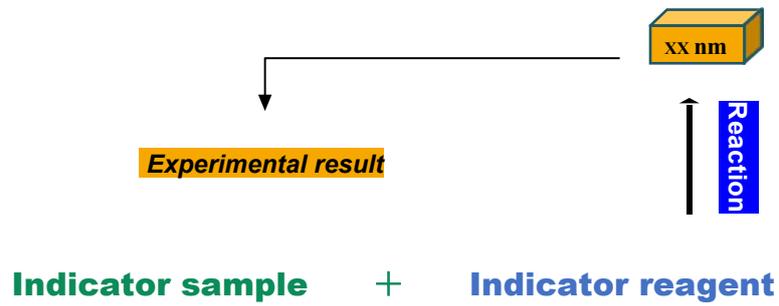


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

硫氧还蛋白过氧化物酶（TPX）检测试剂盒说明书

微量法

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

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。

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。

自备仪器和用品：

低温离心机、水浴锅、可调节移液器、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板（UV板）、和蒸馏水

试剂组成和配制：

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℃保存	-
试剂三	液体×1 支	4℃	-

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℃离心10min，取上清置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量（ 10^4 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℃，离心10min，取上清置于冰上待测。
3. 血清等液体：直接测定。

TPX 测定操作:

1. 分光光度/酶标仪计预热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30min。
3. CAT活性测定管: 取微量石英比色皿或96孔板 (UV板), 加入4 μL上清液, 180 μL试剂一, 16 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: 取微量石英比色皿或96孔板 (UV板), 加入4 μL上清液, 180 μL试剂二, 16 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。TPX 活性计算公式:

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(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。

$$\text{CAT活性 (nmol/min/mg prot)} = (A1 - A2) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T \\ = 573 \times (A1 - A2) \div \text{Cpr}$$

$$\text{总活性 (nmol/min/mg prot)} = (A3 - A4) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T \\ = 573 \times (A3 - A4) \div \text{Cpr}$$

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

(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。

$$\text{CAT活性 (nmol/min/g)} = (A1 - A2) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div (\text{W} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 573 \times (A1 - A2) \div \text{W}$$

$$\text{总活性 (nmol/min/g)} = (A3 - A4) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div (\text{W} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 573 \times (A3 - A4) \div \text{W}$$

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

(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。

$$\text{CAT 活性 (nmol/min/10}^4\text{cell)} = (A1 - A2) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 573 \times \\ (A1 - A2) \div \text{细胞数量}$$

$$\text{总活性 (nmol/min/10}^4\text{cell)} = (A3 - A4) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 573 \times \\ (A3 - A4) \div \text{细胞数量}$$

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

(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。

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

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

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

ϵ : H₂O₂的摩尔消光系数, 43600L/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), 200 μL=2×10⁻⁴ L; Cpr: 上清液蛋白质浓度 (mg/mL); W: 样品质量; V 样: 加入反应体系中上清液体积 (mL), 4 μL=4×10⁻³ mL; V 样总: 提取液体积, 1 mL; T: 反应时间 (min), 2min。

b. 使用96孔板 (UV板) 测定的计算公式如下

(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。

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

$$= 1146 \times (A1 - A2) \div C_{\text{pr}}$$

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

$$= 1146 \times (A3 - A4) \div C_{\text{pr}}$$

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

(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。

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

$$= 1146 \times (A1 - A2) \div W$$

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

$$= 1146 \times (A3 - A4) \div W$$

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

(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。

$$\text{CAT 活性 (nmol/min/10}^4\text{cell)} = (A1 - A2) \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1146 \times$$

$$(A1 - A2) \div \text{细胞数量}$$

$$\text{总活性 (nmol/min/10}^4\text{cell)} = (A3 - A4) \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1146 \times$$

$$(A3 - A4) \div \text{细胞数量}$$

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

(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。

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

$$= 1146 \times (A1 - A2)$$

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

$$= 1146 \times (A3 - A4)$$

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

ϵ : H₂O₂的摩尔消光系数, 43600L/mol/cm=0.0436L/μmol/cm; d: 96 孔板光径, 0.5cm; V反总: 反应体系总体积 (L), 200 μL=2×10⁻⁴L; Cpr: 上清液蛋白质浓度 (mg/mL); W: 样品质量; V 样: 加入反应体系中上清液体积 (mL), 4 μL=4×10⁻³ mL; V 样总: 提取液体积, 1 mL; T: 反应时间 (min), 2min。