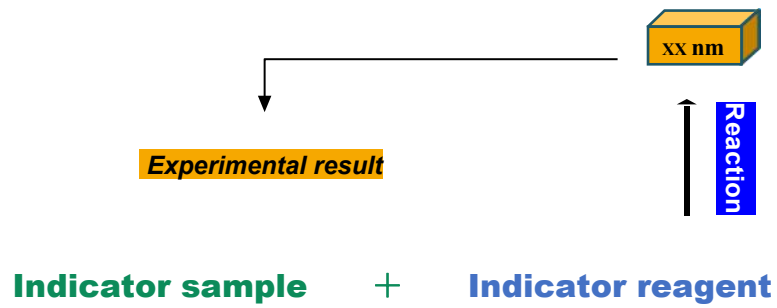


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



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

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

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：

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

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 瓶	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（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℃，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℃（一般物种）或者 37℃（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240 nm 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240 nm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 H_2O_2 。

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。

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

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

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

(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。

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

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

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

(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。

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

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

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

(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, 43600 L/mol/cm=0.0436 L/ μ mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V_{反总}: 反应体系总体积 (L), 1000 μ L=0.001L; C_{pr}: 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。