

硫氧还蛋白过氧化物酶（TPX）活性测定试剂盒说明书

微量法100T/96S

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

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、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H₂O₂氧化二硫苏糖醇（DTT），H₂O₂的吸收波长为240nm，通过测定240nm吸光度的下降速率，即可计算出TPX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：

试剂一：液体120mL×1瓶，室温保存。

试剂二：液体20mL×1瓶，-20℃保存。

试剂三：液体2mL×1支，4℃。

粗酶液提取：

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。

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。

血清等液体：直接测定。

TPX测定操作：

取微量石英比色皿或96孔板，加入4 μL上清液，180 μL试剂二，16 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。

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℃或者37℃中，每毫克蛋白每分钟催化1nmol H₂O₂降解为1个酶活单位。

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

(2). 按样本质量计算

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

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

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

(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。

$$\text{TPX活性 (nmol/min/104 cell)} = (A1 - A2) \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

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

(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。

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

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

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), 200 μ L=2 \times 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 μ L=4 \times 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。

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

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

(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。

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

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

(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。

$$\text{TPX活性 (nmol/min/104 cell)} = (A1 - A2) \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$=1146 \times (A1 - A2) \div \text{细胞数量}$$

(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。

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

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

ϵ : H₂O₂的摩尔消光系数, 43600 L/mol/cm=0.0436 L/ μ mol/cm; d: 96孔板光径, 0.5cm; V反总: 反应体系总体积 (L), 200 μ L=2 \times 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 μ L=4 \times 10⁻³ mL; V样总: 提取液体积, 1 mL; T: 反应时间 (min), 2min。

