

硫氧还蛋白过氧化物酶(TPX)活性检测试剂盒说明书

Thioredoxin Peroxidase Assay Kit

微量法

货号: AK128

规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK128-A	120ml×1 瓶	4℃保存
AK128-B	10ml ×1 瓶	4℃保存
AK128-C	2ml×1 瓶	4℃保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 硫氧还蛋白过氧化物酶 (Thioredoxin peroxidase, 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。

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, 即可计算出 TPX 活性。

自备用品:

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

粗酶液提取:

1. 细菌、细胞: 按照 500 万细菌或细胞加入 1mL AK128-A, 冰浴超声波破碎细菌或细胞 (功率 300W, 超声 3s, 间隔 7s, 总时间 3min); 8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
2. 组织: 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK128-A, 进行冰浴匀浆; 8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
3. 血清等液体: 直接检测。

检测步骤:

1. 分光光度计预热 30min, 调节波长到 240 nm, 蒸馏水调零。
2. AK128-A、B 置于 25℃ (其他物种) 或 37℃ (哺乳动物) 水浴中预热 30min。
3. 按顺序加入下列试剂:

试剂名称	CAT 活性测定管 (ul)	总活性测定管 (ul)
上清液	4	4
AK128-A	180	
AK128-B		180
AK128-C	16	16

迅速混匀, 于 240nm 处测定 10s 和 130s 的吸光度, 分别记为 A1 和 A2 (CAT 活性测定管) 及 A3 和 A4 (总活性测定管)

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 酶活性计算公式:

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。

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

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

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

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。

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

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

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

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。

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

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

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

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

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

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。

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

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

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

注： 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)；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：加入提取液体积，1mL；W，样本质量，g；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。

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

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

$$\text{总活性 (U/mg prot)} = (A3-A4) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T = 1146 \times (A3-A4) \div \text{Cpr}$$

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

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。

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

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

$$\text{总活性 (U/g)} = (A3-A4) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 1146 \times (A3-A4) \div W$$

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

3. 按细胞数量计算

活性单位定义: 25°C 或者 37°C 中, 每 10^4 个细胞每分钟催化 $1\text{nmol H}_2\text{O}_2$ 降解为 1 个酶活单位。

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

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

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

$$= 1146 \times (A3-A4) \div \text{细胞数量}$$

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

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 $1\text{nmol H}_2\text{O}_2$ 降解为 1 个酶活单位。

$$\text{CAT 活性 (U/mL)} = (A1-A2) \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 1146 \times (A1-A2)$$

$$\text{总活性 (U/mL)} = (A3-A4) \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 1146 \times (A3-A4)$$

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

注: ϵ : H_2O_2 的摩尔消光系数, $43600\text{ L/mol/cm} = 0.0436\text{ L/}\mu\text{mol/cm}$; d : 96 孔板光径, 0.5cm ;

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积 (L), $200\text{ uL} = 2 \times 10^{-4}\text{ L}$; C_{pr} : 上清液蛋白质浓度 (mg/mL); W : 样品

质量; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积 (mL), $4\text{ uL} = 4 \times 10^{-3}\text{ mL}$; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1 mL ;

T : 反应时间 (min), 2min 。