

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	液体 120ml×1 瓶	保存
AK128-B	液体 10ml ×1 瓶	保存
AK128-C	2ml×1 瓶	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、台式离心机、可调式移液器、1 mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

粗酶液提取:

1. 细菌、细胞: 按照 500 万细菌或细胞加入 1mL AK127-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°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
2. 组织: 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK127-A, 进行冰浴匀浆; 8000g 4°C 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°C (其他物种) 或 37°C (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	总活性测定管
上清液	4ul	4ul
AK128-A	180ul	
AK128-B		180ul
AK128-C	16ul	16ul
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。

CAT 活性 (nmol/min/mg prot) = (A1-A2) ÷ ε ÷ d × V 反总 ÷ (Cpr × V 样) ÷ T = 573 × (A1-A2) ÷ Cpr

总活性 (nmol/min/mg prot) = (A3-A4) ÷ ε ÷ d × V 反总 ÷ (Cpr × V 样) ÷ T = 573 × (A3-A4) ÷ Cpr

TPX 活性 (nmol/min /mg prot) = 总活性-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。

CAT 活性(nmol/min/g)=(A1-A2) ÷ ε ÷ d × V 反总 ÷ (W × V 样 ÷ V 样总) ÷ T = 573 × (A1-A2) ÷ W

总活性 (nmol/min/g)=(A3-A4) ÷ ε ÷ d × V 反总 ÷ (W × V 样 ÷ V 样总) ÷ T = 573 × (A3-A4) ÷ W

TPX 活性 (nmol/min/g) = 总活性-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。

CAT 活性(nmol/min/10⁴ cell) = (A1-A2) ÷ ε ÷ d × V 反总 ÷ (细胞数量 × V 样 ÷ V 样总) ÷ T

= 573 × (A1-A2) ÷ 细胞数量。

总活性 (nmol/min/10⁴ cell) = (A3-A4) ÷ ε ÷ d × V 反总 ÷ (细胞数量 × V 样 ÷ V 样总) ÷ T

= 573 × (A3-A4) ÷ 细胞数量

TPX 活性 (nmol/min/10⁴ cell) = 总活性-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。

CAT 活性 (nmol/min /mL) = (A1-A2) ÷ ε ÷ d × V 反总 ÷ V 样 ÷ T = 573 × (A1-A2)

总活性 (nmol/min /mL) = (A3-A4) ÷ ε ÷ d × V 反总 ÷ V 样 ÷ T = 573 × (A3-A4)

TPX 活性 (nmol/min /mL) = 总活性-CAT 活性

注： 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)，200 μL=0.0002 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 μL=0.004 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。

CAT 活性 (nmol/min /mg prot) = (A1-A2) ÷ ε ÷ d × V 反总 ÷ (Cpr × V 样) ÷ T

= 1146 × (A1-A2) ÷ Cpr

总活性 (nmol/min /mg prot) = (A3-A4) ÷ ε ÷ d × V 反总 ÷ (Cpr × V 样) ÷ T = 1146 × (A3-A4) ÷ Cpr

TPX 活性 (nmol/min /mg prot) = 总活性-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。

CAT 活性 (nmol/min/g) = (A1-A2) ÷ ε ÷ d × V 反总 ÷ (W × V 样 ÷ V 样总) ÷ T

= 1146 × (A1-A2) ÷ W

总活性 (nmol/min/g) = (A3-A4) ÷ ε ÷ d × V 反总 ÷ (W × V 样 ÷ V 样总) ÷ T = 1146 × (A3-A4) ÷ W

TPX 活性 (nmol/min/g) = 总活性-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。

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

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

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

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

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

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

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

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), $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$; 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), $4 \mu\text{L} = 4 \times 10^{-3} \text{ mL}$; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1 mL ; T : 反应时间 (min), 2min 。