

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, 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°C 保存。

试剂三：液体 2mL×1 支, 4°C。

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°C 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°C, 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：

取微量石英比色皿或 96 孔板, 加入 4 μ L 上清液, 180 μ L 试剂二, 16 μ L 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°C 或者 37°C 中, 每毫克蛋白每分钟催化 1nmol H_2O_2 降解为 1 个酶活单位。

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

(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 H_2O_2 降解为 1 个酶活单位。

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

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

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：25℃或者37℃中，每10⁴个细胞每分钟催化1nmol H₂O₂降解为1个酶活单位。

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

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：25℃或者37℃中，每毫升液体每分钟催化1nmol H₂O₂降解为1个酶活单位。

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

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=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。

$$\begin{aligned} \text{TPX 活性 (nmol/min/mg prot)} &= (A1 - A2) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T \\ &= 1146 \times (A1 - A2) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{TPX 活性 (nmol/min/g 鲜重)} &= (A1 - A2) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 1146 \times (A1 - A2) \div W \end{aligned}$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：25℃或者37℃中，每10⁴个细胞每分钟催化1nmol H₂O₂降解为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{TPX 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= (A1 - A2) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 1146 \times (A1 - A2) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：25℃或者37℃中，每毫升液体每分钟催化1nmol H₂O₂降解为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{TPX 活性 (nmol/min/mL)} &= (A1 - A2) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样} \div T \\ &= 1146 \times (A1 - A2) \end{aligned}$$

ε: H₂O₂的摩尔消光系数, 43600 L/mol/cm=0.0436 L/μmol/cm; d: 96孔板光径, 0.5cm; V反总: 反应体系总体积 (L), 200 μL=2×10⁻⁴ 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。