

硫氧还蛋白过氧化物酶 (TPX) 检测试剂盒 (微量法)

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。

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 (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℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。
- 血清等液体：**直接测定。

TPX 测定步骤：

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℃ 或者 37℃ 中，每毫克蛋白每分钟催化 1nmol H_2O_2 降解为 1 个酶活单位。

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

(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 H_2O_2 降解为 1 个酶活单位。

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

(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。

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

(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。

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

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。

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

(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。

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

(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。

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

(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。

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

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。

