

硫氧还蛋白过氧化物酶（Thioredoxin peroxidase）试剂盒说明书

（分光法 48 样）

一、产品简介：

硫氧还蛋白过氧化物酶（TPx）属于过氧化物酶家族，普遍存在于各种生物体内，主要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。具有抗氧化和调节由过氧化氢介导的信号转导和免疫反应等功能。

本试剂盒利用 TPX 催化 H_2O_2 氧化二硫苏糖醇(DTT)，通过用硫氰酸铁法检测剩余 H_2O_2 ，由于形成的化合物于 475nm 处的吸光值，进而计算出 TPX 活性大小。

二、试剂盒组分与配制

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉体 mg×3 支	4°C保存	用前甩几下使试剂落入底部，每支加 2mL 蒸馏水溶解，三天内用完。
试剂三	液体 mL×1 支	4°C保存	用前甩几下使试剂落入底部，取 11 μ L 至新 EP 管中，再加 1.1mL 蒸馏水混匀，接着再用蒸馏水稀释 100 倍备用。
试剂四	3mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	粉体 mg×4 支	4°C保存	用前甩几下使试剂落入底部，每支加 1.5mL 蒸馏水溶解，现配现用。
试剂六	2.5mL×1 支	4°C保存	

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、低温离心机、移液器、研钵、冰。

四、硫氧还蛋白过氧化物酶（TPx）活性测定：

1、样本制备：

- ① 组织样本：称取约 0.1g 组织（水充足样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液，在 4°C 或冰浴进行匀浆。4°C 约 12,000rpm 离心 10min，取上清作为待测样品。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取

- ② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清，取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，在 4°C 或冰浴进行匀浆。4°C 约 12,000rpm 离心 10min，取上清作为待测样品。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（ 10^4 ）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

- ③ 液体样本：直接测定。

2、上机检测：

- ① 可见分光光度计预热 30 min，调节波长到 475nm，蒸馏水调零。

- ② 所有试剂解冻至室温（25°C），在 EP 管中依次加入：

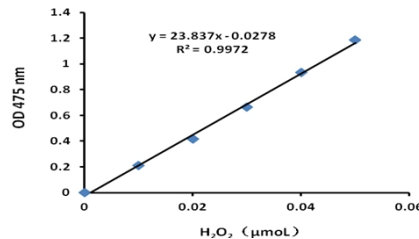
试剂名称（ μ L）	测定管	空白管（仅做一次）
样本	20	
蒸馏水		20
试剂一	330	330
试剂二	100	100

混匀，室温（25℃）孵育 5min		
试剂三	50	50
混匀，室温（25℃）反应 2min		
试剂四	50	50
试剂五	100	100
试剂六	50	50
混匀，测定管需室温（25℃）12000rpm 离心 2min，再同空白管一起取全部澄清液体至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，立即于 475nm 处读值， $\Delta A=A$ 空白-A 测定。		

【注】若测定管没有颜色即 TPx 活性高，需减少样本加样体积 V1(如减至 5 μ L，则试剂一相应增加)，或缩短反应时间 T(如室温反应 2min 缩至 1min 或更短)；若 ΔA 在零附近即测定管颜色接近空白管，需增加加样体积 V1(如增至 40 μ L，则试剂一相应减少)，或延长反应时间 T(如延至 5min 或更长)；则改变后的 V1 和 T 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1.标准曲线： $y=23.837x - 0.0278$ 。x 是 H₂O₂ 摩尔质量（ μ mol），y 为吸光值 ΔA 。



2. 按蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克蛋白每分钟降解 1 μ molH₂O₂ 为 1 个酶活单位。

$$\text{TPx 酶活 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0278) \div 23.837] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \times D \\ = 1.05 \times (\Delta A + 0.0278) \div \text{Cpr} \times D$$

3. 按样本质量计算：

酶活定义：每克样本每分钟氧化降解 1 μ molH₂O₂ 为 1 个酶活单位。

$$\text{TPx 酶活 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0278) \div 23.837] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ = 1.05 \times (\Delta A + 0.0278) \div W \times D$$

4. 按细胞数量计算：

酶活定义：每 10⁴ 个细胞每分钟降解 1 μ molH₂O₂ 为 1 个酶活单位。

$$\text{TPx 酶活 } (\mu\text{mol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0278) \div 23.837] \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \div T \times D \\ = 1.05 \times (\Delta A + 0.0278) \div \text{细胞数量} \times D$$

5. 按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟降解 1 μ molH₂O₂ 为 1 个酶活单位。

$$\text{TPx 酶活 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0278) \div 23.837] \div V1 \div T \times D = 1.05 \times (\Delta A + 0.0278) \times D$$

V---提取液体积，1 mL；

V1---上清液体积，20 μ L=0.02 mL；

D---稀释倍数；

W---样本质量，g；

T---反应时间，2min；

Cpr---上清液蛋白浓度（mg/mL）：建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

1 标准品母液（1 μ mol/mL）：即稀释 100 倍后备用的试剂三。

2 把母液稀释成六个梯度：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 μ mol/mL。

3 在 EP 管依次加入：20 μ L 蒸馏水+430 μ L 试剂一+50 μ L 标准品+50 μ L 试剂四+100 μ L 试剂五+50 μ L 试剂六，混匀取澄清液体至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，立即于 475nm 处读值，依据结果即可制作标准曲线。