

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

（微板法 96 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 100mL×1 瓶 | 4°C保存 |   |
| 试剂一  | 液体 35mL×1 瓶  | 4°C保存 |   |
| 试剂二  | 粉体 mg×3 支    | 4°C保存 | 使用前甩几下使试剂落入底部，每支加 4mL 蒸馏水溶解，三天内用完。                                    |
| 试剂三  | 液体 mL×1 支    | 4°C保存 | 使用前甩几下使试剂落入底部，取 11 $\mu$ 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  | 5mL×1 瓶      | 4°C保存 |   |
| 试剂五  | 粉体 mg×4 支    | 4°C保存 | 使用前甩几下使试剂落入底部，每支加 3mL 蒸馏水溶解，现配现用。                                     |
| 试剂六  | 5mL×1 瓶      | 4°C保存 |   |

## 三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、低温离心机、移液器、研钵、冰和蒸馏水。

## 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（水分充足样本可取 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 酶标仪预热 30 min，调节波长到 475 nm。

② 所有试剂解冻至室温（25°C），在 EP 管中依次加入：

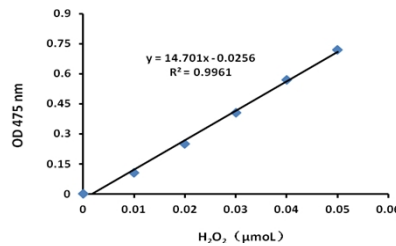
| 试剂名称（ $\mu$ L） | 测定管 | 空白管（仅做一次） |
|----------------|-----|-----------|
| 样本             | 20  |           |
| 蒸馏水            |     | 20        |
| 试剂一            | 330 | 330       |

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 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 5min，再同空白管一起取 200μL 澄清液体至 96 孔板中，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 5μL，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  $\Delta A$  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 40μL，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： $y = 14.701x - 0.0256$ 。x 是  $H_2O_2$  摩尔质量 ( $\mu\text{mol}$ )，y 为吸光值  $\Delta A$ 。



2. 按蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克蛋白每分钟降解  $1\mu\text{mol}H_2O_2$  为 1 个酶活单位。

$$\text{TPx 酶活 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0256) \div 14.701] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \times D \\ = 1.7 \times (\Delta A + 0.0256) \div \text{Cpr} \times D$$

3. 按样本质量计算：

酶活定义：每克样本每分钟氧化降解  $1\mu\text{mol}H_2O_2$  为 1 个酶活单位。

$$\text{TPx 酶活 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0256) \div 14.701] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ = 1.7 \times (\Delta A + 0.0256) \div W \times D$$

4. 按细胞数量计算：

酶活定义：每  $10^4$  个细胞每分钟降解  $1\mu\text{mol}H_2O_2$  为 1 个酶活单位。

$$\text{TPx 酶活 } (\mu\text{mol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0256) \div 14.701] \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \div T \times D \\ = 1.7 \times (\Delta A + 0.0256) \div \text{细胞数量} \times D$$

5. 按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟降解  $1\mu\text{mol}H_2O_2$  为 1 个酶活单位。

$$\text{TPx 酶活 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0256) \div 14.701] \div V1 \div T \times D = 1.7 \times (\Delta A + 0.0256) \times D$$

V---提取液体积，1 mL； V1---上清液体积，20μL=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 ( $1\mu\text{mol}/\text{mL}$ )：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,  $1\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。
- 3 在 EP 管依次加入：20μL 蒸馏水+430μL 试剂一+50μL 标准品+50μL 试剂四+100μL 试剂五+50μL

---

试剂六，混匀取 200 $\mu$ L 澄清液体至 96 孔板，立即于 475nm 处读值，依据结果即可制作标准曲线。