

## 硫氢还蛋白过氧化物酶（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 广泛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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化二硫苏糖醇（DTT），H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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℃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<sup>4</sup> 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。

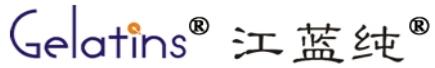
### **TPX 测定操作：**

取微量石英比色皿或 96 孔板，加入 4 μL 上清液，180 μL 试剂二，16 μL 试剂三，迅速混匀后于 240 nm 测定 10s 和 130s 吸光度，记为 A<sub>1</sub> 和 A<sub>2</sub>。

### **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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 降解为 1 个酶活单位。TPX (nmol/min /mg prot) = (A<sub>1</sub> - A<sub>2</sub>) ÷ ε ÷ d × V 反总 ÷ (Cpr × V 样) ÷ T  
= 573 × (A<sub>1</sub> - A<sub>2</sub>) ÷ Cpr

(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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 降解为 1 个酶活单位。TPX  
活性 (nmol/min/g 鲜重) = (A<sub>1</sub> - A<sub>2</sub>) ÷ ε ÷ d × V 反总 ÷ (W × V 样 ÷ V 样总) ÷ T  
= 573 × (A<sub>1</sub> - A<sub>2</sub>) ÷ W

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：25℃ 或者 37℃ 中，每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟催化 1nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 降解为 1 个酶活单位。