

硫氧还蛋白过氧化物酶 (thioredoxin peroxidase, TPX) 活性测定试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

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：

紫外分光光度计、低温离心机、水浴锅、可调节移液器、1mL 石英比色皿和蒸馏水

试剂组成和配制：

试剂一：液体 50mL×1 瓶，室温保存。

试剂二：液体 50mL×1 瓶，-20℃保存。

试剂三：液体 5mL×1 瓶，4℃。

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℃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℃，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：

1. 分光光度计预热 30min，调节波长到 240 nm，蒸馏水调零。
2. 试剂二置于 25℃（一般物种）或者 37℃（哺乳动物）水浴预热 30 min。
3. 取 1mL 石英比色皿，加入 20 μ L 上清液，900 μ L 试剂二，80 μ L 试剂三，迅速混匀后于 240 nm 测定 10 s 和 130 s 吸光度，记为 A1 和 A2。

TPX 活性计算公式：

(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。

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

$$= 573 \times (A1 - A2) \div C_{\text{pr}}$$

(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。

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

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

(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。

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

$$= 573 \times (A1 - A2) \div \text{细胞数量}$$

(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。

$$\text{TPX 活性 (nmol/min /mL)} = (A1 - A2) \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T$$

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

ϵ : H₂O₂ 的摩尔消光系数, 43600 L/mol/cm=0.0436 L/ μ mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V_{反总}: 反应体系总体积 (L), 1000 μ L=0.001 L; C_{pr}: 上清液蛋白质浓度 (mg/mL); V_样: 加入反应体系中上清液体积 (mL), 20 μ L=0.02 mL; V_{样总}: 加入提取液体积, 1mL; W, 样本质量, g; T: 反应时间 (min), 2min。