



硫氧还蛋白过氧化物酶(TPX)试剂盒-可见显色法

可见分光光度法

货号: R43859-48S

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。

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℃保存	
试剂一	液体20mL×1瓶	4℃保存	
试剂二	粉体mg×3支	4℃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℃保存	用前甩几下使试剂落入底部, 取11 μL 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℃保存	
试剂五	粉体mg×4支	4℃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℃保存	

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。



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℃ 或冰浴进行匀浆。4℃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℃或冰浴进行匀浆。4℃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℃),在EP管中依次加入:

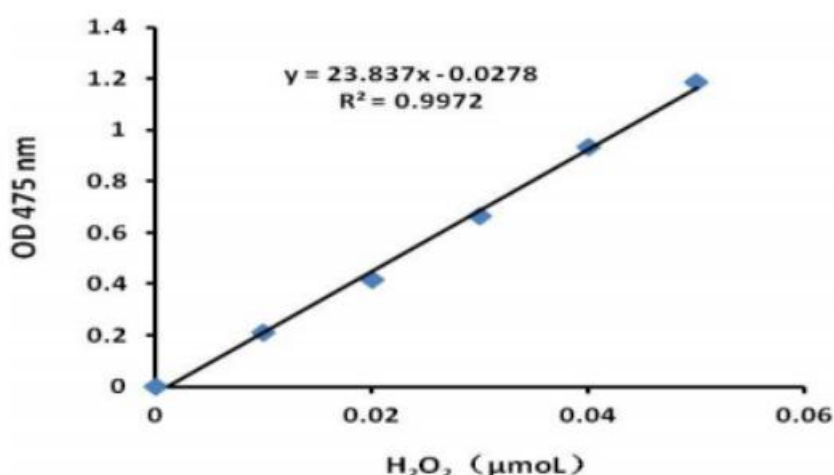
试剂名称(μL)	测定管	空白管(仅做一次)
样本	20	
蒸馏水		20
试剂一	330	330
试剂二	100	100
混匀, 室温(25℃)孵育5min		
试剂三	50	50
混匀, 室温(25℃)反应2min		
试剂四	50	50
试剂五	100	100
试剂六	50	50
混匀, 测定管需室温(25℃)12000rpm离心2min,再同空白管一起取全部澄清液体至1mL玻璃比色皿(光径1cm)中, 立即于475nm处读值, $\Delta A = A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}$ 。		



【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。

结果计算:

1. 标准曲线: $y=23.837x-0.0278$ 。x 是 H₂O₂ 摩尔质量(μmol),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 1μmolH₂O₂ 为1个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{TPx 酶活}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0278) \div 23.837] \div (\text{Cpr} \times V_1) \div T \times D \\ &= 1.05 \times (\Delta A + 0.0278) \div \text{Cpr} \times D\end{aligned}$$

3. 按样本质量计算:

酶活定义: 每克样本每分钟氧化降解 1μmolH₂O₂为1个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{TPx 酶活}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0278) \div 23.837] \div (W \times V_1 \div V) \div T \times D \\ &= 1.05 \times (\Delta A + 0.0278) \div W \times D\end{aligned}$$

4. 按细胞数量计算:

酶活定义: 每10⁴个细胞每分钟降解 1μmolH₂O₂为1个酶活单位。

$$\text{TPx 酶活}(\mu\text{mol}/\text{min}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A + 0.0278) \div 23.837] \div (\text{细胞数量} \times V_1 \div V) \div T \times D$$



$$=1.05 \times (\Delta A + 0.0278) - \text{细胞数量} \times D$$

5. 按液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体每分钟降解 $1\mu\text{molH}_2\text{O}_2$ 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, 1mL;

V1--- 上清液体积, $20\mu\text{L} = 0.02\text{ mL}$;

D---- 稀释倍数;

W--- 样本质量, g;

T--- 反应时间, 2min;

Cpr---- 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: $20\mu\text{L}$ 蒸馏水 + $430\mu\text{L}$ 试剂一 + $50\mu\text{L}$ 标准品 + $50\mu\text{L}$ 试剂四 + $100\mu\text{L}$ 试剂五 + $50\mu\text{L}$ 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。