

硫氧还蛋白过氧化物酶 (TPX) 活性测定试剂盒说明书(精简版)

(货号: A118-1-1 Thioredoxin peroxidase, 分光光度法 100T/48 样)

一、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。

二、测定原理

TPX催化H₂O₂氧化二硫苏糖醇(DTT),H₂O₂的吸收波长为240nm,通过测定240nm吸光度的下降速率,通过对照减去过氧化氢酶(CAT)催化分解的H₂O₂,即可计算出TPX活性。因此,本试剂盒可以同时测定样品TPX和CAT活性。

三、自备仪器用品

低温离心机、紫外分光光度计、水浴锅、1mL石英比色皿、可调节移液枪、蒸馏水

四、试剂组成和配制

试剂一 液体×1 瓶,室温保存;

试剂二 液体×1 瓶,-20℃保存;

试剂三 液体×1 支,4℃保存。

五、粗酶液提取

1.组织:按照组织质量(g):试剂一体积(mL)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。10000g,4℃离心10min,取上清置冰上待测。

2.细菌、真菌:按照细胞数量(10⁴个):试剂一体积(mL)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(功率300W,超声3s,间隔7秒,总时间3min);在4℃下1000g离心10min,取上清,置冰上待测。

六、TPX测定步骤

1.分光光度计预热30min以上,调节波长到240nm,用蒸馏水调零;

2.试剂一和试剂二置于37℃(哺乳动物)或25℃(其它物种)预热30min以上;

3.CAT活性测定管:取1mL石英比色皿,加入20μL上清液,900μL试剂一,80μL试剂三,迅速混匀后与240nm测定10s和130s吸光度,分别为A₁和A₂,计算ΔA_{CAT}=A₁-A₂

4.总活性测定管:取1mL石英比色皿,加入20μL上清液,900μL试剂二,80μL试剂三,迅速混匀后与240nm测定10s和130s吸光度,分别为A₃和A₄。ΔA_总=A₃-A₄

注:对大量样品,每个样品都需要单独测定其CAT活性。

七、TPX活性计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

活性单位定义:在37℃或25℃,每毫克蛋白每分钟催化1μmol H₂O₂为1U。

$$\text{CAT活性(U/mg prot)} = \frac{\Delta A_{\text{CAT}} \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}}}{(\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T} = 0.573 \times \Delta A_{\text{CAT}} \div \text{Cpr}$$

$$\text{总活性(U/mg prot)} = \frac{\Delta A_{\text{总}} \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}}}{(\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T} = 0.573 \times \Delta A_{\text{总}} \div \text{Cpr}$$

TPX活性(U/mg prot) = 总活性 - CAT活性

(2) 按样本质量计算

单位的定义:在37℃或25℃,每g组织每分钟催化1μmol H₂O₂为1U。

$$\text{CAT活性(U/g)} = \frac{\Delta A_{\text{CAT}} \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}}}{(W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T} = 0.573 \times \Delta A_{\text{CAT}} \div W$$

$$\text{总活性(U/g)} = \frac{\Delta A_{\text{总}} \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}}}{(W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T} = 0.573 \times \Delta A_{\text{总}} \div W$$

TPX活性(U/g) = 总活性 - CAT活性

(3) 按细胞数量计算

单位的定义:在37℃或25℃,每10⁴个细胞每分钟催化1μmol H₂O₂为1U。

$$\text{CAT活性(U/10}^4 \text{ cells)} = \frac{\Delta A_{\text{CAT}} \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}}}{(\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T} = 0.573 \times \Delta A_{\text{CAT}} \div \text{细胞数量}$$

$$\text{总活性(U/10}^4 \text{ cells)} = \frac{\Delta A_{\text{总}} \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}}}{(\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T} = 0.573 \times \Delta A_{\text{总}} \div \text{细胞数量}$$

TPX活性(U/10⁴ cells) = 总活性 - CAT活性

ε: H₂O₂在240nm处摩尔吸光系数为4.36×10⁴L/mol/cm=0.0436 L/μmol/cm;

d: 比色皿光径(cm), 1cm;

V_{反应}: 反应体系总体(L), 1000μL=1×10⁻³L;

Cpr: 上清液蛋白质浓度(mg/mL),需要另外测定,建议使用本公司BCA蛋白质含量测定试剂盒;

V_样: 加入反应体系中上清液体积(mL), 20μL=0.02mL;

V_{样总}: 加入提取液体积, 1mL;

T: 催化反应时间(min), 2min;

W: 样本质量,(g);

细胞数量,(10⁴)。