

硫氧还蛋白过氧化物酶 (TPX) 活性测定试剂盒

(货号: BC049 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 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,通过对照减去过氧化氢酶(CAT)催化分解的 H_2O_2 ,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°C保存;

试剂三 液体×1 支, 4°C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°C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)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°C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°C(哺乳动物)或25°C(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20 μ L上清液,900 μ L试剂一,80 μ L试剂三,迅速混匀后与240nm测定10s和130s吸光度,分别为 A_1 和 A_2 ,计算 $\Delta A_{CAT}=A_1-A_2$
4. 总活性测定管: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,迅速混匀后与240nm测定10s和130s吸光度,分别为 A_3 和 A_4 。 $\Delta A_{总}=A_3-A_4$

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°C或25°C,每毫克蛋白每分钟催化1 μ mol H_2O_2 为1U。

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

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

$$\text{TPX活性(U/mg prot)} = \text{总活性} - \text{CAT活性}$$

(2) 按样本质量计算

单位的定义:在37°C或25°C,每g组织每分钟催化1 μ mol H_2O_2 为1U。

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

$$=0.573 \times \Delta A_{\text{CAT}} \div W$$

$$\begin{aligned} \text{总活性 (U/g)} &= \Delta A_{\text{总}} \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.573 \times \Delta A_{\text{总}} \div W \end{aligned}$$

$$\text{TPX活性 (U/g)} = \text{总活性} - \text{CAT活性}$$

(3) 按细胞数量计算

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

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

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

$$\text{TPX活性 (U/10}^4 \text{ cells)} = \text{总活性} - \text{CAT活性}$$

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_{反总}: 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)。