CheKine™ 硫氧还蛋白过氧化物酶（TPX）检测试剂盒（微量法）

货号: KTB1660　　规格: 48 T/48 S　96 T/96 S　　批号：见产品标签

	适用样本：动物组织、细胞、细菌、血清（浆）
	保质期：-20℃，避光保存 12 个月

01 背景与原理

硫氧还蛋白过氧化物酶（Thioredoxin Peroxidase，TPX）（EC 1.11.1.24）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，功能与谷胱甘肽过氧化物酶（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。

本试剂盒检测原理是 TPX 能够催化 H_2O_2氧化底物二硫苏糖醇（DTT）。在反应过程中，底物 H_2O_2在 240 nm 波长处具有特征吸收峰；随着酶促反应的进行，H_2O_2被不断消耗，导致该波长下的吸光度值随之下降。通过测定 240 nm 吸光度的下降速率，测定样品 TPX 活性。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Assay Buffer	60 mL	60 mL×2	4℃
Substrate	11 mL	22 mL	-20℃，避光保存
H_2O_2	1 mL	2 mL	4℃，避光保存

***请在实验前检查各组分的量。**

***各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。**

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 240 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	UV 板
试剂	PBS	样本清洗用
其他	匀浆器（组织样本）、制冰机、水浴锅、低温离心机、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- **正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。**
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，**请在实验全程做好生物安全防护**，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Assay Buffer	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Substrate	即用型；使用前平衡至室温	-20℃避光保存；**Substrate 有一定的刺激性，建议在使用过程中做好个人防护**
H_2O_2	即用型；使用前平衡至室温	4℃避光保存

05-2 样本制备

注意：样品处理等过程均需要在冰上进行，且须在当日测定酶活力。推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存一个月。细胞中 TPX 活性测定时，细胞数目须在 3-5×10^6 之间，提取细胞中 TPX 时可加 Assay Buffer 后研磨或超声波处理，不能用细胞裂解液处理细胞。

- **动物组织**：称取约 0.1 g 样本，加入 1 m Assay Buffer，冰浴匀浆，8000 g，4℃离心 10 min，取上清置冰上待测。
- **细胞或细菌**：收集 5×10^6 个细胞或细菌，用预冷的 PBS 清洗细胞或细菌，800 g 离心 2 min，弃上清。加入 1 mL Assay Buffer 进行冰浴超声破碎。超声波破碎 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），8000 g，4℃离心 10 min，取上清置于冰上待测。
- **血清（浆）**：直接测定。

05-3 实验步骤

1. **酶标仪准备**：预热 30 min 以上，调节波长到 240 nm。
2. 检测前，Substrate 置于 25℃（普通物种）或者 37℃（哺乳动物）中预热 30 min 以上。
3. **检测体系配制**：在 96 孔 UV 板中加样，每孔先加入 4 μL 上清液，再加入 180 μL Substrate，最后加入 16 μL H_2O_2，轻柔晃动孔板，使各组分混合均匀。
4. **吸光度检测**：测定 240 nm 处的吸光值，分别记录 10 s 和 2 min 10 s 吸光值，记为 A_1 和 A_2。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧**二维码**或访问官网[https://www.abbkine.cn] > 进入“**技术中心**”> 查找“**在线计算器**”**工具**。

06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算$\Delta A=A_1-A_2$

2. 样本 TPX 活性计算

- 按蛋白浓度计算

活性单位(U)定义：25℃或者 37℃中，每毫克蛋白每分钟催化 1 nmol H_2O_2 降解。

TPX 活性(U/mg prot)=$\Delta A\div(\varepsilon\times d)\times V_{反总}\div(Cpr\times V_{样})\div T$**=1147×ΔA÷Cpr**

- 按样本鲜重计算

活性单位(U)定义：25℃或者 37℃中，每克样品每分钟催化 1 nmol H_2O_2 降解。

TPX 活性(U/g)=$\Delta A\div(\varepsilon\times d)\times V_{反总}\div(V_{样}\div V_{样总}\times W)\div T$**=1147×ΔA÷W**

- 按细胞或细菌数量计算

活性单位(U)定义：25℃或者 37℃中，每 10^4 个细胞或细菌每分钟催化 1 nmol H_2O_2 降解。

TPX 活性(U/10^4)=$\Delta A\div(\varepsilon\times d)\times V_{反总}\div(N\times V_{样}\div V_{样总})\div T$**=1147×ΔA÷N**

- 按液体体积计算

活性单位(U)定义：25℃或者 37℃中，每毫升液体每分钟催化催化 1 nmol H_2O_2 降解。

TPX 活性(U/mL)=$\Delta A\div(\varepsilon\times d)\times V_{反总}\div V_{样}\div T$**=1147×ΔA**

ε：H_2O_2 摩尔消光系数，43600 L/mol/cm=0.0436 mL/nmol/cm；d：96 孔 UV 板光径，0.5 cm；$V_{反总}$：反应体系总体积，200 μL=0.2 mL；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；W：样品质量，g；$V_{样}$：加入反应体系中上清液体积，4 μL=4×10^{-3} mL；$V_{样总}$：提取液体积，1 mL；T：反应时间，2 min；N：细胞或细菌数量，以 10^4 为单位（例如细胞数量为 5×10^6，N=500）。

07 结果展示

示例-1：取 0.1 g 小鼠肝脏，按照测定步骤操作，用 96 孔 UV 板进行检测。测得$\Delta A=A_1-A_2$=1.096-0.995=0.101，按样本质量计算得：TPX 活性(U/g)=1147×ΔA÷W=1158.47 U/g。

示例-2：取 0.1 g 小鼠肾脏，按照测定步骤操作，用 96 孔 UV 板进行检测。测得$\Delta A=A_1-A_2$=0.673-0.606=0.067，按样本质量计算得：TPX 活性(U/g)=1147×ΔA÷W=768.49 U/g。

08 FAQ

- **检测得到的样本ΔA 过高或者过低怎么办?**

如果ΔA 小于 0.002 可适当加大样本量。如果ΔA 大于 0.4，样本可用 Extraction Buffer 进一步稀释，或减少提取用样本量，再重新进行测定。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1150	CheKine™ 过氧化物酶（POD）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1040	CheKine™ 过氧化氢酶（CAT）活性分析试剂盒（微量法）
KTB1030	CheKine™ 超氧化物歧化酶（SOD）活力检测试剂盒（微量法）

CheKine™ 硫氧还蛋白过氧化物酶（TPX）检测流程示意图

（Abbkine 货号：KTB1660）

