



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

硫氧还蛋白氧化还原酶(TrxR)活性检测试剂盒 (可见分光光度法)

货号: R41836

规格: 50T/48S

保质期: 6个月

产品组成及保存条件:

名称	规格	储存条件
试剂-A	100ml×1瓶	2-8℃保存
试剂-B	粉剂×1瓶	2-8℃避光保存; 临用前加入5mL 1xPBS缓冲液溶解(3天内使用完)。
试剂-C	粉剂×1瓶	2-8℃保存; 临用前加入5mL蒸馏水溶解(3天内使用完)。
试剂-D	30μL×1支	-20℃保存; 临用前根据样本数量将其用无水乙醇稀释10倍后使用。

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

简介

意义: 硫氧还蛋白还原酶 (Oxidized Thioredoxin Reductase, TrxR) 是一种 NADPH 依赖的包含 FAD结构域的二聚体硒酶, 属于吡啶核苷酸-二硫化物氧化还原酶家族成员, 与硫氧还蛋白以及 NADPH 共同构成了硫氧还蛋白系统。TrxR 与 GR 活性类似, 催化 GSSG 还原生成 GSH, 是谷胱甘肽氧化还原循环关键酶之一。

原理: TrxR催化NADPH还原DTNB生成TNB和NADP⁺, TNB在412 nm有特征吸收峰, 但还原型谷胱甘肽与DTNB同样能反应生成TNB, 同时又利用2-乙烯吡啶抑制样本中原有的还原型谷胱甘肽, 然后通过测定412nm波长处TNB的增加速率, 即可计算TrxR活性。

自备用品:



可见分光光度计、1ml 玻璃比色皿、水浴锅、天平、离心机、可调式液枪、研钵、蒸馏水、1xPBS 缓冲液。

粗酶液提取:

1. 组织: 按照组织质量 (g): 试剂-A 体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入1mL 试剂-A) 进行冰浴匀浆, 8000g, 4℃ 离心 10min, 取上清置冰上待测。

2. 细菌、细胞: 按照细胞数量 (10^4 个): 试剂-A 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500万细胞加入 1mL 试剂-A), 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。

测定步骤:

1. 分光光度计预热 30 min, 调节波长到 412nm, 用蒸馏水调零。
2. 试剂-A在 25℃ (一般物种) 或者 37℃ (哺乳动物) 预热 30min; 测定前将样本上清液与试剂-D以50: 1的体积比混匀 (即取100μL上清液加入2μL 试剂-D混合) 37℃ 水浴30min后至冰上。

3. 按下表加入下列试剂:

试剂名称	空白管(ul)	测定管(ul)
试剂-B	100	
试剂-C	100	
试剂-A	160	
迅速混匀后于412nm测定10s时的吸光度, 37℃水浴5min迅速拿出测量412nm下的吸光度, 记为A1和A2,计算 ΔA 空白管=A2-A1。		
试剂-B		100
试剂-C		100
试剂-A		700
上清液		100
迅速混匀后于412nm测定10s时的吸光度, 37℃水浴5min迅速拿出测量412nm下的吸光度, 记为A3和A4,计算 ΔA 测定管=A4-A3。		



注意: 空白管只需测定 1-2 次

TrxR 活性计算公式:

(1) 按蛋白浓度计算

活性单位定义: 在 25°C 或者 37°C 中, 每毫克蛋白每分钟催化 1nmol DTNB 还原为 1 个酶活单位。

$$\text{TrxR (U/mg prot)} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T \\ = 147 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义: 在 25°C 或 37°C 中, 每克样本每分钟催化 1nmol DTNB 还原为 1 个酶活单位。

$$\text{TrxR (U/g)} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 147 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义: 在 25°C 或者 37°C 中, 每 10⁴ 个细胞每分钟催化 1nmol DTNB 还原为 1 个酶活单位。

$$\text{TrxR (U/10}^4 \text{ cell)} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \\ \div V \text{ 样总}) \div T = 147 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义: 在 25°C 或者 37°C 中, 每毫升液体每分钟催化 1nmol DTNB 还原为 1 个酶活单位。

$$\text{TrxR (U/mL)} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样} \div T \\ = 147 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管})$$

注: ϵ : TNB 在 412nm 处的摩尔消光系数, 1.36×10^4 L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 反总: 反应体系总体积 (L), $1000 \mu\text{L} = 1 \times 10^{-3}$ L; Cpr: 上清液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定; W: 样品质量; V 样: 加入反应体系中上清液体积 (mL), $100 \mu\text{L} = 0.1$ mL; V 样总: 提取液体积, 1 mL; T: 反应时间 (min), 5 min; 5min; 细胞数量: 以 10⁴ 为单位, 万个; 10⁹: 单位换算系数 $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

注意事项:



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

1. 测定前须先取 1~2 个样做预实验, 使得吸光值在 5min 内程线性变化; 哺乳动物组织及血液制品TrxR 活力测定时, 一般须用蒸馏水稀释 5 倍左右; 测定过程操作须迅速。

2. 由于试剂-A 中含有一定浓度的蛋白 (约 0.1mg/mL), 所以在测定样品蛋白浓度时需要减去提取液本身的蛋白。



源叶