

硫氧还蛋白氧化还原酶 (TrxR) 活性检测试剂盒 (微量法) (本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0243	硫氧还蛋白氧化还原酶 (TrxR) 活性检测试剂盒	100 管/96 样

产品内容

名称	规格	储存条件
提取液	液体×1 瓶	4°C
试剂一	粉剂 ×1 瓶: 临用前加入 2mL 蒸馏水溶解。	4°C, 避光。
试剂二	粉剂 ×1 管: 临用前加入 2mL 蒸馏水溶解。	4°C

一、产品说明

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。

TrxR 催化 NADPH 还原 DTNB 生成 TNB 和 NADP⁺, TNB 在 412nm 有特征吸收峰, 通过测定 412nm 波长处 TNB 的增加速率, 即可计算 TrxR 活性。

二、自备材料

低温离心机、可调节移液器、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96孔板、和蒸馏水。

三、样本准备:

- 1、组织: 组织: 按照组织质量 (g): 试剂一体积(mL)为 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。8000g, 4°C 离心 10min, 取上清置冰上待测。
- 2、细菌或细胞: 按照细胞数量 (10⁴ 个): 试剂一体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一), 冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 然后 8000g, 4°C, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。
- 3、血清或血浆: 直接检测。

四、操作步骤

正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 412nm, 蒸馏水调零。
- 2、试剂一在 25°C (一般物种) 或者 37°C (哺乳动物) 预热 30min。
- 3、空白管: 取微量玻璃比色皿或 96 孔板, 加入 20μL 试剂二, 20μL 试剂三, 160μL 试剂一, 迅速混匀后于 412nm 测定 10s 和 310s 吸光度, 记为 A1 和 A2。ΔA 空白管=A2-A1。
- 4、测定管: 取微量玻璃比色皿或 96 孔板, 加入 20μL 试剂二, 20μL 试剂三, 140μL 试剂一, 20μL 上清液, 迅速混匀后于 412nm 测定 10s 和 310s 吸光度, 记为 A3 和 A4。ΔA 测定管=A4-A3。

五、TrxR 活力的计算

用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、按照组织样本蛋白浓度计算:

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。

$$\text{TrxR (nmol/min/mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T。$$

2、按照组织样本鲜重计算

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

$$\text{TrxR (nmol/min/g)} = (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 147 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W。$$

3、按照细菌/细胞密度计算:

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

$$\text{TrxR (nmol/min/10}^4\text{cell)} = (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 147 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{细胞数量}。$$

4、按照液体体积计算

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。

$$\text{TrxR (nmol/min/mL)} = (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 147 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}})。$$

ϵ : TNB 在412nm处的微摩尔消光系数, 0.0136 L/ μ mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm;

V 反总: 反应体系总体积 (L), 200 μ L=2 \times 10⁻⁴ 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), 20 μ L=0.02 mL;

V 样总: 提取液体积, 1 mL; T: 反应时间 (min), 5 min。

用96孔板测定的计算公式如下

1、按照组织样本蛋白浓度计算

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。

$$\text{TrxR (nmol/min/mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 294 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{Cpr}。$$

2、按照组织样本鲜重计算

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

$$\text{TrxR (nmol/min/g)} = (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 294 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W。$$

3、按照细菌/细胞密度计算

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

$$\text{TrxR (nmol/min/10}^4\text{cell)} = (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 294 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{细胞数量}。$$

4、按照液体体积计算

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。

$$\text{TrxR (nmol/min/mL)} = (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 294 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}})。$$

ϵ : TNB 在412nm处的微摩尔消光系数, 0.0136 L/ μ mol/cm; d: 96 孔板光径, 0.5cm; V
反总: 反应体系总体积 (L), 200 μ L= 2×10^{-4} 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), 20 μ L=0.02 mL;
V 样总: 提取液体积, 1 mL; T: 反应时间 (min), 5 min。

六、注意事项

- 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、试剂二和试剂三配制好后 3 天内使用完。