硫氧还蛋白还原酶(TrxR)活性检测试剂盒说明书

Oxidized Thioredoxin Reductase Assay Kit

可见分光光度法

货号：AK129

规格：50T/48S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
AK129-A	100ml×1 瓶	4℃保存；
AK129-B	粉剂×1 瓶	4℃避光保存；临用前加入 5 mL 蒸馏水溶解 (3 天内使用完)。
AK129-C	粉剂×1 瓶	4℃保存；临用前加入 5 mL 蒸馏水溶解 (3 天内使用完)。

※ 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，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：

紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、水浴锅、天平、烘箱、玻璃管、离心机、可调式移液枪、蒸馏水。

粗酶液提取：

1. 组织：按照组织质量（g）：AK129-A 体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL AK129-A）进行冰浴匀浆。8000g，4℃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）：AK129-A 体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL AK129-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. AK129-A 在 25℃（一般物种）或者 37℃（哺乳动物）预热 30min。
3. 在 1mL 玻璃比色皿管中加入下列试剂：

试剂名称	空白管 (ul)	测定管 (ul)
AK129-B	100	
AK129-C	100	
AK129-A	800	
迅速混匀后于 412 nm 测定 10 s 和 310 s 吸光度，记为 A1 和 A2。 △A 空白管=A2-A1。		
AK129-B		100
AK129-C		100
AK129-A		700

上清液		100
迅速混匀后于 412 nm 测定 10 s 和 310 s 吸光度，记为 A3 和 A4。 △A 测定管=A4-A3。		

注意：空白管只需测定一次。

TrxR 活性计算公式：

1. 按蛋白浓度计算

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

   TrxR (nmol/min /mg prot) = (△A 测定管-△A 空白管)÷ε÷d×V 反总÷(Cpr×V 样)÷T = 147×(△A 测定管-△A 空白管)÷Cpr

2. 按样本质量计算

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

   TrxR (nmol/min/g) = (△A 测定管-△A 空白管)÷ε÷d×V 反总÷(W×V 样÷V 样总)÷T = 147×(△A 测定管-△A 空白管)÷W

3. 按细胞数量计算

   活性单位定义：在 25℃或者 37℃中，每 10^4 个细胞每分钟催化 1nmol DTNB 还原为 1 个酶活单位。

   TrxR (nmol/min/10^4 cell) = (△A 测定管-△A 空白管)÷ε÷d×V 反总÷(细胞数量×V 样÷V 样总)÷T = 147×(△A 测定管-△A 空白管)÷细胞数量

4. 按液体体积计算

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

   TrxR (nmol/min /mL) = (△A 测定管-△A 空白管)÷ε÷d×V 反总÷V 样÷T = 147×(△A 测定管-△A 空白管)

   注： 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)，1000μL=0.001 L；Cpr：上清液蛋白质浓度(mg/mL)，需要另外测定；V 样：加入反应体系中上清液体积(mL)，100μL=0.1 mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；W，样本质量，g；T：反应时间(min)，5 min。

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。