

硫氧还蛋白氧化还原酶（thioredoxin reductase, TrxR）试剂盒说明书

微量法100T/96S

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

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。

测定原理：

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。

自备仪器和用品：

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。

试剂组成和配制：

试剂一：液体120mL×1瓶，4℃保存。

试剂二：液体2mL×1瓶，4℃避光保存。

试剂三：粉剂×1管，4℃保存。临用前加入2mL蒸馏水溶解。

粗酶液提取：

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℃离心10min，取上清置冰上待测。

细菌、真菌：按照细胞数量（ 10^4 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℃，离心10min，取上清置于冰上待测。

3. 血清等液体：直接测定。

TrxR测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热30 min，调节波长到412nm，用蒸馏水调零。
2. 试剂一在25℃（一般物种）或者37℃（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412 nm测定10 s和310 s吸光度，记为A1和A2。 $\Delta A_{\text{空白管}} = A2 - A1$ 。
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412 nm测定10 s和310 s吸光度，记为A3和A4。 $\Delta A_{\text{测定管}} = A4 - A3$ 。

硫氧还蛋白氧化还原酶（thioredoxin reductase, TrxR）试剂盒说明书注意：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。

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

$$= 147 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div C_{\text{pr}}$$

(2). 按样本质量计算

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。

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

$$= 147 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W$$

(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。

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

$$= 147 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{细胞数量}$$

(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; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积 (L), 200 μ L=2 $\times 10^{-4}$ L; C_{pr} : 上清液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定; W: 样品质量; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积 (mL), 20 μ L=0.02 mL; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1 mL; T: 反应时间 (min), 5 min。

b.使用96孔板测定的计算公式如下

(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。

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

$$= 294 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div C_{\text{pr}}$$

(2). 按样本质量计算

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。

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

$$= 294 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W$$

(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。

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

$$= 294 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{细胞数量}$$

(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; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积 (L), 200 μ L=2 $\times$ 10⁻⁴L; C_{pr} : 上清液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定; W : 样品质量; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积 (mL), 20 μ L=0.02 mL; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1 mL; T : 反应时间 (min), 5 min。

注意事项:

测定前须先取1~2个样做预实验, 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。

试剂二和试剂三配制好后3天内使用完。