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°C保存。

试剂二：液体2mL×1瓶，4°C避光保存。

试剂三：粉剂×1管，4°C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°C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°C，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°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412 nm测定10 s和310 s吸光度，记为A1和A2。△A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。△A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°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。

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°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。

TrxR（nmol/min /g 鲜重）=（△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°C或者37°C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°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。

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）

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），200μL=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），20μL=0.02 mL；V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。

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

= 294×（△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°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。

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

= 294×（△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°C或者37°C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

= 294×（△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°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。

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

= 294×（△A测定管-△A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），200μL=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），20μL=0.02 mL；V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。