

硫氧还蛋白还原酶(TrxR)活性检测试剂盒说明书

Oxidized Thioredoxin Reductase Assay Kit

微量法

货号: AK130

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

	规格	储存条件
AK130-A	120ml×1 瓶	4℃保存;
AK130-B	粉剂×1 瓶	4℃避光保存; 临用前加入 2 mL 1XPBS 缓冲液溶解(3 天内使用完)。
AK130-C	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加入 2 mL 蒸馏水溶解 (3 天内使用完)。
AK130-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-乙炔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/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、水浴锅、天平、烘箱、玻璃管、离心机、可调式液枪、蒸馏水、1XPBS 缓冲液。

粗酶液提取:

1. 组织: 按照组织质量 (g): AK130-A 体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK130-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 (10⁴ 个): AK130-A 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL AK130-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. AK130-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AK130-D以50: 1的体积比混匀 (即取100μL上清液加入2μL AK130-D混合) 37℃水浴30min后至冰上。
3. 在微量玻璃比色皿或 96 孔板加入下列试剂:

试剂名称	空白管 (ul)	测定管 (ul)
AK130-B	20	
AK130-C	20	
AK130-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。		
AK130-B		20

AK130-C		20
AK130-A		140
上清液		20
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：

a. 用微量石英比色皿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℃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。

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

(2) 按样本质量计算

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

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

(3) 按细胞数量计算

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

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

(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。

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

注： ϵ ：TNB 在 412nm 处的摩尔消光系数，1.36 $\times 10^4$ L/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；5min；细胞数量：以10⁴为单位，万个；10⁹：单位换算系数，1mol=10⁹nmol。

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℃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。

$$\begin{aligned}\text{TrxR (U/mg prot)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T \\ &= 294 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned}\text{TrxR (U/g)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 294 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W\end{aligned}$$

(3) 按细胞数量计算

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

$$\begin{aligned}\text{TrxR (U/10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V \text{ 反总} \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 294 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

(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。

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

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

注： ϵ ：TNB 在412nm处的摩尔消光系数， $1.36 \times 10^4 \text{ L} / \mu\text{mol} / \text{cm}$ ； d ：96 孔板光径，0.5cm； $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积（L）， $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ； 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）， $20 \mu\text{L} = 0.02 \text{ mL}$ ； $V_{\text{样总}}$ ：提取液体积，1 mL； T ：反应时间（min），5 min，5min；细胞数量：以 10^4 为单位，万个； 10^9 ：单位换算系数， $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

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. 由于 AK130-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。