

硫氧还蛋白还原酶(TrxR)活性检测试剂盒说明书

Oxidized Thioredoxin Reductase Assay Kit

分光光度法

货号: AK129

规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

	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 1xPBS 缓冲液溶解 (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)。
AK129-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、1ml 玻璃比色皿、水浴锅、天平、离心机、可调式液枪、研钵、蒸馏水、1xPBS 缓冲液。

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、细胞: 按照细胞数量 (10⁴ 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; 测定前将样本上清液与AK129-D以50: 1的体积比混匀 (即取100μL上清液加入2μL AK129-D混合) 37℃水浴30min后至冰上。
3. 按下表加入下列试剂:

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 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。		
AK129-B		100

AK129-C		100
AK129-A		700
上清液		100
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：

(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，1.36×10⁴ L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 反总：反应体系总体积 (L)，1000μL=1×10⁻³L；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)，100μL=0.1mL；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。

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 AK129-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。