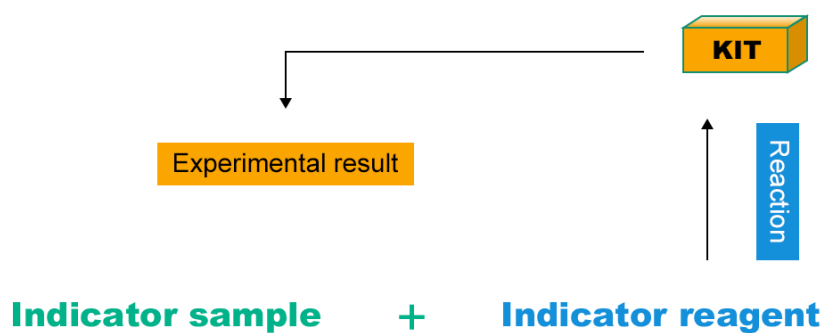


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0327

Size: 100T/96S

硫氧还蛋白氧化还原酶 (TrxR) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、测定原理:

TrxR 催化 NADPH 还原 DTNB 生成 TNB 和 NADP^+ , TNB 在 412nm 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。

三、需自备的仪器和用品:

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。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃避光保存	临用前加入 2mL 蒸馏水溶解
试剂三	粉剂×1 管	4℃保存	临用前加入 2mL 蒸馏水溶解

五、粗酶液提取：

1. 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。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量（10⁴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。

六、TrxR 测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热30min，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20 μL试剂二，20 μL试剂三，160 μL试剂一，迅速混匀后于412nm 测定10s和310s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20 μL试剂二，20 μL试剂三，140 μL试剂一，20 μL上清液，迅速混匀后于412nm测定10s和310s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。

七、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℃或者37℃中，每克样本每分钟催化1nmol DTNB还原为1个酶活单位。

$$\text{TrxR (nmol/min/g)} = (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 147 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：在25℃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。

$$\text{TrxR (nmol/min/10}^4\text{cell)} = (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 147 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：在25℃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。

$$\text{TrxR (nmol/min/mL)} = (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ = 147 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}})$$

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 = 2×10^{-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。

● 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。

$$\text{TrxR (nmol/min/mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \\ = 294 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div C_{\text{pr}}$$

(2). 按样本质量计算

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

$$\text{TrxR (nmol/min/g)} = (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 294 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：在25℃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。

$$\text{TrxR (nmol/min/10}^4\text{cell)} = (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 294 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：在25℃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。

$$\text{TrxR (nmol/min/mL)} = (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T$$
$$= 294 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}})$$

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 = 2×10^{-4} L; Cpr: 上清液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定; W : 样品质量; $V_{\text{样}}$: 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。

八、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 内呈线性变化。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。