

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

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

### 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<sup>+</sup>, 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。

### 组成:

产品名称	GSH013-50T/48S	Storage
试剂一: 液体	90ml	4°C
试剂二: 液体	5ml	4°C避光
试剂三: 粉剂	1 瓶	4°C
说明书	一份	

试剂三: 粉剂×1 瓶, 4°C保存。临用前加入 5 ml 蒸馏水溶解。

### 自备仪器和用品:

可见分光光度计、低温离心机、可调节移液器、1ml 玻璃比色皿和蒸馏水。

### 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°C离心 10min, 取上清置冰上待测。
2. 细菌、真菌: 按照细胞数量 (10<sup>4</sup> 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:

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司

江苏省连云港市海州区花果山大道 17 号



服务热线: 0518-81263339

官网:<http://www.bio149.com>

1. 分光光度计预热 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. 测定管：取 1ml 玻璃比色皿，加入 100μl 试剂二，100μl 试剂三，**700μl 试剂一**，**100μl 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。ΔA 测定管=A2-A1。

### 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。

$$\begin{aligned}\text{TrxR (nmol/min/mg prot)} &= \Delta A \text{ 测定管} \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T \\ &= 147 \times \Delta A \text{ 测定管} \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

#### (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。

$$\begin{aligned}\text{TrxR (nmol/min/g 鲜重)} &= \Delta A \text{ 测定管} \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div (\text{W} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 147 \times \Delta A \text{ 测定管} \div \text{W}\end{aligned}$$

#### (3) 按细胞数量计算

活性单位定义：在 25°C 或者 37°C 中，每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟催化 1nmol DTNB 还原为 1 个酶活单位。

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

#### (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。

$$\begin{aligned}\text{TrxR (nmol/min/ml)} &= \Delta A \text{ 测定管} \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样} \div T \\ &= 147 \times \Delta A \text{ 测定管}\end{aligned}$$

ε: TNB 在 412nm 处的微摩尔消光系数, 0.0136 L/μmol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 反总: 反应体系总体积 (L), 1000μl=0.001 L; Cpr: 上清液蛋白质浓度 (mg/ml), 需要另外测定; V 样: 加入反应体系中上清液体积 (ml), 100μl=0.1 ml; V 样总: 加入提取液体积, 1ml; W, 样本质量, g; T: 反应时间 (min), 5 min。

### 注意事项:

1. 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。
2. 试剂二和试剂三配制好后 3 天内使用完。

