

硫氧还蛋白还原酶 (TrxR) 检测试剂盒 (微量法)

货号: PMK1021

保存: -20℃避光保存 12 个月

规格: 48T/96T

适用样本: 血清 (浆)、动植物组织、细胞、细菌

产品简介

硫氧还蛋白还原酶 (TrxR) 是一种 NADPH 依赖的二聚体硒酶, 包含 FAD 结构域, 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。本试剂盒提供了一种简单的检测方法检测生物样本, 如血清 (浆)、动植物组织、细胞及细菌样本中 TrxR 的活性。TrxR 催化 NADPH 还原 GSSG 生成 GSH 和 NADP⁺, DTNB 与 GSH 反应生成黄色产物 TNB, 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。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
试剂一	60mL	120mL	4℃保存
试剂二	1mL	2mL	4℃避光保存
试剂三	1	1	-20℃避光保存

自备耗材

酶标仪或可见分光光度计 (能测 412nm 处的吸光度)

96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头

恒温箱、制冰机、低温离心机

去离子水

匀浆器 (如果是组织样本)

试剂准备

试剂一: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4℃保存。

试剂二: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4℃避光保存。

试剂三: 粉剂; 使用前, 96T 加入 2mL 去离子水溶解, 48T 加 1mL 去离子水溶解; 溶解后的试剂三分装-20℃避光保存。

样本制备

动植物组织: 称取 0.1g 组织样本, 加入 1mL 预冷的试剂一, 冰上匀浆。匀浆后的样本, 10,000g, 4℃离心 10min, 取上清液, 置冰上待测。

细胞或细菌: 收集 500 万细胞或细菌到离心管内, 用冷 PBS 清洗细胞, 离心后弃上清, 加入 1mL 预冷的试剂一, 冰浴超声波破碎细胞或细菌 5min (功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 7s, 重复 30 次), 然后 10,000 g, 4℃离心 10min, 取上清液, 置冰上待测。

血清 (浆) 等液体样本: 直接测定。

注意: 1. 推荐使用新鲜样本, 如果不立即进行实验, 样本可在-80℃保存 1 个月, 样品处理等过程均需要在冰上进行, 且须在当日测定酶活力, 匀浆液避免反复冻融。

2. 细胞中 TrxR 的提取时不能用细胞裂解液处理细胞。

3. 如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 法蛋白质定量试剂盒，进行样本蛋白质浓度测定。由于试剂一中含有一定浓度的蛋白（约 0.1mg/mL），所以在测定样本蛋白浓度时需要减去试剂一本身的蛋白含量。

实验步骤

1. 酶标仪或可见光分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 412 nm，可见光分光光度计去离子水调零。

2. 试剂一置于 25℃（一般物种）或者 37℃（哺乳动物）预热 30 min。

3. 样本测定：在 96 孔板或微量玻璃比色皿中依次加入 20 μL 试剂二，20 μL 试剂三，140 μL 试剂一，20 μL 样本，迅速混匀后于 412nm 测定 10s 和 310s 吸光度，记为 A_1 和 A_2 ，计算 $\Delta A = A_2 - A_1$

注意：1. 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果 ΔA 小于 0.001 可适当加大样本量；如果 ΔA 大于 0.3，样本可用去离子水进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数。哺乳动物组织及血液制品 TrxR 活力测定时，一般须用去离子水稀释 5 倍左右。

2. 测定反应的温度对测定结果有影响，请控制在 25℃（一般物种）或者 37℃（哺乳动物）。

3. 因通过反应速率计算酶活，使用 96 孔 UV 板时请根据操作速度控制一次测定的样本数（通常一次测定 4-8 个样本）。

结果计算

A. 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（U）定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化 1nmol DTNB 还原为 1 个酶活单位。

$$\text{TrxR (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 294 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

（2）按样本鲜重计算

活性单位（U）定义：每 g 组织在反应体系中每分钟催化 1nmol DTNB 还原为 1 个酶活单位。

$$\text{TrxR (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 294 \times \Delta A \div W$$

（3）按细胞数量计算

活性单位（U）定义：每 10^4 个细胞在反应体系中每分钟催化 1nmol DTNB 还原为 1 个酶活单位。

$$\text{TrxR (U/10}^4 \text{ Cells)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 294 \times \Delta A \div 500 = 0.588 \times \Delta A$$

（4）按液体体积计算

活性单位（U）定义：每毫升液体样本在反应体系中每分钟催化 1nmol DTNB 还原为 1 个酶活单位。

$$\text{TrxR (U/mL)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}} \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 294 \times \Delta A$$

ϵ ：TNB 在 412nm 处的微摩尔消光系数， $13.6 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d ：96 孔板光径，0.5cm； $V_{\text{反应}}$ ：反应体系总体积， $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ； 10^9 ： $1 \text{ mol} = 1 \times 10^9 \text{ nmol}$ ； Cpr ：上清液蛋白质浓度，mg/mL； W ：样品质量，g； $V_{\text{样}}$ ：加入反应体系中上清液体积， $20 \mu\text{L} = 0.02 \text{ mL}$ ； $V_{\text{样总}}$ ：提取液体积，1mL； T ：反应时间，5min；500：细胞数量， 5×10^6 。

B. 使用微量比色皿进行测定的计算公式

将上述计算公式中光径 d ：0.5cm 调整为 d ：1cm 进行计算即可。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1022 谷胱甘肽还原酶（GR）检测试剂盒（微量法）

PMK1023 还原型谷胱甘肽（GSH）检测试剂盒（微量法）

PMK1024 氧化型谷胱甘肽（GSSG）检测试剂盒（微量法）

PMK1027 谷胱甘肽 S-转移酶（GST）检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

