

# 硫氧还蛋白氧化还原酶活性测定试剂盒说明书(精简版)

(货号: A119-1-1 thioredoxin reductase, TrxR 分光光度法 50T/48样)

## 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<sup>+</sup>, 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、自备实验用品及仪器

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。

## 四、试剂组成和配制

试剂一: 液体×1 瓶, 4℃保存。

试剂二: 液体×1 瓶, 4℃避光保存。

试剂三: 粉剂L×1 瓶, 4℃保存。临用前加入5ml蒸馏水溶解。

## 五、粗酶液提取

1. 组织: 按照组织质量(g): 提取液体体积(mL) 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(10<sup>4</sup>个): 提取液体体积(mL) 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(浆)等液体样本: 直接取样测定。

## 六、TrxR测定操作

1. 分光光度计预热30min后, 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1ml玻璃比色皿, 加入100μL试剂二, 100μL试剂三, 800μL试剂一, 迅速混匀后于412nm测定10s和310s吸光度, 记为A1和A2。ΔA空白管=A2-A1。
4. 测定管: 取取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412nm测定10s和310s吸光度, 记为A3和A4。ΔA测定管=A4-A3。

## 七、计算公式

1. 组织、细菌或细胞中TrxR活力计算

(1)、按蛋白质浓度计算

**单位(U)定义:** 在25℃或者37℃中每毫克组织蛋白每分钟催化1nmolDTNB还原定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{TrxR活力 (U/mgprot)} &= \frac{\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\varepsilon \times d} \times \frac{V_{\text{反应总}}}{V_{\text{样}} \times \text{Cpr}} \div T \\ &= 147 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2)、按样本重量计算

**单位(U)定义:** 在25℃或者37℃中, 每克样本每分钟催化1nmolDTNB还原定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{TrxR活力 (U/g鲜重)} &= \frac{\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\varepsilon \times d} \times \frac{V_{\text{反应总}}}{V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}} \div T \\ &= 147 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W \end{aligned}$$

(3)、按细胞数量计算

**单位(U)定义:** 在25℃或者37℃中, 每10<sup>4</sup>个细胞每分钟催化1nmolDTNB还原定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{TrxR活力 (U/10}^4\text{cells)} &= \frac{\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\varepsilon \times d} \times \frac{V_{\text{反应总}}}{V_{\text{样}} \times \text{细胞数} \div V_{\text{样总}}} \div T \\ &= 147 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div \text{细胞数} \end{aligned}$$

2、按液体体积计算

**单位(U)定义:** 在25℃或者37℃中, 每ml样本每分钟催化1nmolDTNB还原定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{TrxR活力 (U/mL)} &= \frac{\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\varepsilon \times d} \times \frac{V_{\text{反应总}}}{V_{\text{样}}} \div T \\ &= 147 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \end{aligned}$$

**ε:** TNB在412nm处的微摩尔消光系数, 0.0136L/μmol/cm;

**d:** 比色皿光径, 1cm;

**V<sub>反应总</sub>:** 反应体系总体积(L), 1000μL=0.001L;

**Cpr:** 上清液蛋白质浓度(mg/mL)

**V<sub>样</sub>:** 加入反应体系中上清液体积(mL), 100μL=0.1mL;

**V<sub>样总</sub>:** 加入提取液体积, 1mL;

**W:** 样本质量, g;

**T:** 反应时间, 5min。

### 注意事项

测定前须先取1~2个样做预实验, 使得吸光值在5min内成线性变化。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。