

## 硫氧还蛋白还原酶 (thioredoxin reductase, TrxR) 活性试剂盒说明书 (货号: G0216F 分光法 48 样)

### 一、产品简介:

硫氧还蛋白还原酶 (TrxR, EC 1.6.4.5) 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。

硫氧还蛋白还原酶 (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活性大小。

### 二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 mg×2 支	4°C保存	使用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部, 每支再加 1.1mL 蒸馏水溶解; 溶解后-20°C保存 2 周。
试剂二	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 2mL×1 支	4°C保存	固体出现可以 25°C水浴 5min, 使其呈液体状态。

### 三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、蒸馏水

### 四、硫氧还蛋白还原酶 (TrxR) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

#### 1、样本制备

① 组织样本: 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。4°C×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 4°C×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10<sup>4</sup>): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

#### 2、上机检测

① 可见分光光度计预热 30 min, 设置温度在 25°C, 设定波长到 412 nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂在使用前均须在室温或 25°C水浴锅中温育 10min。

③ 在 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	80
试剂一	40
试剂二	580

试剂三	40
立即混匀，于 412nm 波长下 30s 时读取初始吸光度 A1，10min 后再测一次吸光度 A2； $\Delta A = A2 - A1$ 。	

## 五、结果计算：

### 1、按蛋白浓度计算：

定义：在 25°C 下，每毫克蛋白每分钟还原 1nmol DTNB 生成 TNB 为一个酶活单位。

$$\text{TrxR 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V2) \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \times D = 68 \times \Delta A \div \text{Cpr} \times D$$

### 2、按样本质量计算：

定义：在 25°C 下，每克样本每分钟还原 1nmol DTNB 生成 TNB 为一个酶活单位。

$$\text{TrxR 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V2) \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 68 \times \Delta A \div W \times D$$

### 3、按细胞/细菌数量计算：

定义：在 25°C 下，每 10<sup>4</sup> 个细胞/细菌样本每分钟还原 1nmol DTNB 生成 TNB 为 1 个酶活单位。

$$\text{TrxR 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V2) \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D = 0.14 \times \Delta A \times D$$

### 4、按液体体积计算：

定义：在 25°C 下，每毫升液体样本每分钟还原 1nmol DTNB 生成 TNB 为 1 个酶活单位。

$$\text{TrxR 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V2) \div V1 \div T \times D = 68 \times \Delta A \times D$$

$\epsilon$ ---TNB 摩尔消光系数， $1.36 \times 10^4 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$ ； $d$ ---光径，1cm；

W---样本质量，g；

V---提取液体积，1 mL；

V1---样本体积， $80 \mu\text{L} = 0.08 \text{ mL}$ ；

V2---反应体系总体积， $740 \mu\text{L} = 7.4 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

D---稀释倍数，未稀释，即为 1；

T---反应时间，10min，

Cpr---上清液蛋白浓度 (mg/mL)；建议使用本公司 BCA 蛋白质含量检测试剂盒；