

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

微量法 100T/96S

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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⁺, 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。

自备仪器和用品：

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。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 120mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂二：液体 2mL×1 瓶, 4℃ 避光保存。

试剂三：粉剂×1 管, 4℃ 保存。临用前加入 2mL 蒸馏水溶解。

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。

TrxR 测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min, 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 20μL 试剂二, 20μL 试剂三, 160μL 试剂一, 迅速混匀后于 412 nm 测定 10 s 和 310 s 吸光度, 记为 A1 和 A2。ΔA 空白管=A2-A1。
4. **测定管**：取微量玻璃比色皿或 96 孔板, 加入 20μL 试剂二, 20μL 试剂三, 140μL 试剂一, 20μL 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=A4-A3。

注意：空白管只需测定一次。

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。

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

(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。

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

$$= 147 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

(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。

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

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：在 25℃ 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。

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

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 反总: 反应体系总体积 (L), 200 μ L=2 \times 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 样: 加入反应体系中上清液体积 (mL), 20 μ L=0.02 mL; V 样总: 提取液体积, 1 mL; T : 反应时间 (min), 5 min。

b. 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。

$$\begin{aligned} \text{TrxR (nmol/min /mg prot)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div (C_{pr} \times V \text{ 样}) \div T \\ &= 294 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div C_{pr} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{TrxR (nmol/min /g 鲜重)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 294 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{TrxR (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 294 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：在 25℃ 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。

$$\begin{aligned} \text{TrxR (nmol/min /mL)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样} \div T \\ &= 294 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \end{aligned}$$

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 反总: 反应体系总体积 (L), 200 μ L=2 \times 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 样: 加入反应体系中上清液体积 (mL), 20 μ L=0.02 mL; V 样总: 提取液体积, 1 mL; 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，使得吸光值在 5min 内程线性变化。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。