

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

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：

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。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 90mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂二：液体 5mL×1 瓶, 4℃ 避光保存。

试剂三：粉剂×1 瓶, 4℃ 保存。临用前加入 5 mL 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. 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℃ 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。

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

(2). 按样本质量计算

活性单位定义：在 25℃ 或者 37℃ 中, 每克样本每分钟催化 1nmol DTNB 还原为 1 个酶活单位。

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

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：在 25℃ 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。

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

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：在 25℃ 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。

$$\begin{aligned}\text{TrxR (nmol/min/mL)} &= \Delta A_{\text{测定管}} \div \epsilon \div d \times V_{\text{反应}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 147 \times \Delta A_{\text{测定管}}\end{aligned}$$

ϵ : TNB 在 412nm 处的微摩尔消光系数, 0.0136 L/ μ mol/cm; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{反应}}$: 反应体系总体积 (L), 1000 μ L=0.001 L; C_{pr} : 上清液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积 (mL), 100 μ L=0.1 mL; $V_{\text{样总}}$: 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, 使得吸光值在 5min 内呈线性变化。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。