

硫氧还蛋白还原酶（thioredoxin reductase, TrxR）活性试剂盒说明书 (微板法 96 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 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×2 支	4℃保存	使用前甩几下或4℃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℃保存2周。
试剂二	液体 12mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 2mL×1 支	4℃保存	固体出现可以25℃水浴5min,使其呈液体状态。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96孔板、低温离心机、水浴锅、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℃×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℃×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（10⁴）：提取液（mL）为500~1000：1的比例进行提取。

2、上机检测

① 酶标仪预热30min，设置温度在25℃，设定波长到412nm。

② 所有试剂在使用前均须在室温或25℃水浴锅中温育10min。

③ 在96孔酶标板中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管
样本	40
试剂一	20
试剂二	120
试剂三	20

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； $\Delta A = A2 - A1$ 。

【注】：若 ΔA 变化小，可延长反应时间 T（如延至 15min 或更长），或增加样本上样量 V1（如增至 60 μ L，则试剂二相应减少）；则改变后的 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按蛋白浓度计算：

酶活定义：在 25 $^{\circ}$ C 下，每毫克蛋白每分钟还原 1nmol DTNB 生成 TNB 为一个酶活单位。

TrxR 酶活(nmol/min/mg prot) = $(\Delta A \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V2) \div (Cpr \times V1) \div T \times D = 147.1 \times \Delta A \div Cpr \times D$

2、按样本质量计算：

酶活定义：在 25 $^{\circ}$ C 下，每克样本每分钟还原 1nmol DTNB 生成 TNB 为一个酶活单位。

TrxR 酶活(nmol/min/g 鲜重) = $(\Delta A \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V2) \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 147.1 \times \Delta A \div W \times D$

3、按细胞/细菌数量计算：

酶活定义：在 25 $^{\circ}$ C 下，每 10⁴ 个细胞/细菌样本每分钟还原 1nmol DTNB 生成 TNB 为 1 个酶活单位。

TrxR 酶活(nmol/min/10⁴ cell) = $(\Delta A \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V2) \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D = 0.3 \times \Delta A \times D$

ϵ ---TNB 摩尔消光系数，1.36 $\times 10^4$ L/mol/cm；

d---光径，0.5 cm；

W---样本质量，g；

V---提取液体积，1 mL；

V1---样本体积，20 μ L = 0.02mL；

V2---反应体系总体积，200 μ L = 2 $\times 10^{-4}$ 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；