

硫氧还蛋白氧化还原酶 (TrxR) 活性检测试剂盒 (微量法)

产品货号: BA1191

产品规格: 50管/48样

产品简介:

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。

TrxR催化NADPH还原DTNB生成TNB和NADP⁺,TNB在412nm有特征吸收峰,但还原型谷胱甘肽与DTNB同样能反应生成TNB,因此本试剂盒利用2-乙炔吡啶抑制样本中原有的还原型谷胱甘肽,通过测定412nm波长处TNB的增加速率,即可计算TrxR活性。

注意: 实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品内容:

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体120mL×1瓶	2-8℃
试剂二	液体3mL×1瓶	2-8℃
试剂三	粉剂×2支	-20℃
试剂四	液体30μL×1瓶	-20℃

溶液的配制:

1. 试剂三: 临用前取1支加入1.667mL蒸馏水溶解,用不完的试剂-20℃保存1周。
2. 试剂四: 临用前根据样本数量将试剂四用无水乙醇稀释10倍后使用。

需自备的仪器和用品:

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、研钵/匀浆器、蒸馏水、无水乙醇。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量,具体比例可以参考文献)

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。10000rpm, 4℃离心10min, 取上清置冰上待检测。
2. 细菌、细胞: 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3s, 间隔7s, 总时间3min), 然后10000rpm, 4℃, 离心10min, 取上清置于冰上待测。

注: 测定前将上清液与试剂四以50: 1的体积比混匀 (即取100μL上清液加入2μL试剂四混合) 37℃水浴30min后至冰上。

二、测定操作

1. 分光光度计或酶标仪预热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:** 取微量玻璃比色皿或96孔板, 加入20 μL试剂二, 20 μL试剂三, 160 μL试剂一, 迅速混匀后于412nm测定10s时的吸光度, 37℃水浴5min迅速拿出测量412nm下的吸光度记为A1和A2。计算ΔA空白管=A2-A1。
4. **测定管:** 取微量玻璃比色皿或96孔板, 加入20 μL试剂二, 20 μL试剂三, 140 μL试剂一, 20 μL上清液, 迅速混匀后于412nm测定10s时的吸光度, 37℃水浴5min迅速拿出测量412nm下的吸光度, 记为A3和A4。ΔA测定管=A4-A3。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

三、TrxR活性计算

a.使用微量玻璃比色皿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，每毫克蛋白每分钟生成1nmol TNB为一个酶活力单位。

$$\text{TrxR (U/mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ = 147 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：在25℃或者37℃中，每克样本每分钟生成1nmol TNB为一个酶活力单位。

$$\text{TrxR (U/g 质量)} = (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ = 147 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：在25℃或者37℃中，每10⁴个细胞每分钟生成1nmol TNB为一个酶活力单位。

$$\text{TrxR (U/10}^4\text{cell)} = (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 147 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{细胞数量}$$

ϵ ：TNB在412nm处的摩尔消光系数，1.36×10⁴L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V反总：反应体系总体积，200μL=2×10⁻⁴L；Cpr：上清液蛋白质浓度（mg/mL），需要另外测定；W：样本质量，g；V样：加入反应体系中上清液体积，20μL=0.02mL；V样总：提取液体积，1mL；T：反应时间，5min；细胞数量：以10⁴为单位，万个；10⁹：单位换算系数，1mol=10⁹nmol。

b.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，每毫克蛋白每分钟生成1nmol TNB为一个酶活力单位。

$$\text{TrxR (U/mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ = 245 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：在25℃或者37℃中，每克样本每分钟生成1nmol TNB为一个酶活力单位。

$$\text{TrxR (U/g 质量)} = (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ = 245 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：在25℃或者37℃中，每10⁴个细胞每分钟生成1nmol TNB为一个酶活力单位。

$$\text{TrxR (U/10}^4\text{cell)} = (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 245 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{细胞数量}$$

ϵ ：TNB在412nm处的摩尔消光系数，1.36×10⁴L/mol/cm；d：96孔板光径，0.6cm；V反总：反应体系总体积，200μL=2×10⁻⁴L；Cpr：上清液蛋白质浓度（mg/mL），需要另外测定；W：样本质量，g；V样：加入反应体系中上清液体积，20μL=0.02mL；V样总：提取液体积，1mL；T：反应时间，5min；细胞数量：以10⁴为单位，万个；10⁹：单位换算系数，1mol=10⁹nmol。

注意事项：

1. 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. 由于试剂一中含有一定浓度的蛋白（约0.1mg/mL），所以在测定样品蛋白浓度时需要减去提取液本身的蛋白含量。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com