硫氧还蛋白还原酶(TrxR)检测试剂盒(分光光度法)

产品货号：BA3203

产品规格：50T/48S

产品简介：

TrxR(EC，EC1.8.1.9)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-乙烯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。

试剂盒组分：

试剂名称	规格	保存要求
试剂一	液体100mL×1瓶	2-8℃
试剂二	液体6mL×1瓶	2-8℃
试剂三	粉剂×2瓶	-20℃
试剂四	液体30μL×1支	-20℃

溶液的配制：

1. 试剂三：试剂放于瓶内玻璃瓶中，临用前取1瓶加入3.33mL蒸馏水溶解，用不完的试剂-20℃保存2周；
2. 试剂四：体积量少，请离心后再使用。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：

可见分光光度计、低温离心机、可调节移液器、1mL玻璃比色皿、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、蒸馏水、冰和无水乙醇(>98%，AR)。

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，4C离心10min，取上清置冰上待检测。
2. 细菌、细胞：按照细胞数量(10^4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。
3. 血清(血浆)等液体：直接按测定步骤中“样本混合物的配制”步骤进行即可。

二、测定步骤：

1. 分光光度计预热30min后，调节波长到412nm，用蒸馏水调零。
2. 试剂一37℃预热30min。
3. 样本混合物的配制：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后置冰上。
4. 操作表：(在玻璃比色皿中加入下列试剂)

试剂名称(μL)	测定管	空白管
试剂二	100	100

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

试剂三	100	100
试剂一	700	800
样本混合物	100	-
将上述试剂分别加入微量玻璃比色皿/后迅速吹打混匀，记录第10s时412nm的吸光值A1测定(A1空白)，迅速置于37℃水浴或培养箱5min，拿出迅速擦干测定5min10s时的吸光值A2测定(A2空白)，计算ΔA=(A2测定-A1测定)-(A2空白-A1空白)。空白管只需测1-2次。		

三、TrxR活性计算:

1) 按蛋白浓度计算

活性单位定义：在37℃条件下，每毫克蛋白每分钟生成1nmolTNB为一个酶活力单位。

TrxR活性(U/mg prot)=ΔA÷(ε×d)×10^9×V反总÷(Cpr×V样)÷T=147×ΔA÷Cpr

2) 按样本质量计算

活性单位定义：在37℃条件下，每克样本每分钟生成1nmolTNB为一个酶活力单位。

TrxR活性(U/g 质量)=ΔA÷(ε×d)×10^9×V反总÷(V样÷V样总×W)÷T=147×ΔA÷W

3) 按细胞数量计算

活性单位定义：在37℃条件下，每10^4个细胞每分钟生成1nmolTNB为一个酶活力单位。

TrxR活性(U/10^4cell)=ΔA÷(ε×d)×10^9×V反总÷(N×V样÷V样总)÷T=147×ΔA÷N

4) 按液体体积计算:

活性单位定义:在37℃条件下，每mL液体每分钟生成1nmolTNB为一个酶活力单位。

TrxR活性(U/mL)=ΔA÷(ε×d)×10^9×V样本÷V样÷T=147×ΔA

ε：TNB在412nm处的摩尔消光系数，1.36×10^4L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V反总：反应体系总体积，1000μL=0.001L；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，100μL=0.1mL；V样总：前处理中试剂一体积，1mL；T：反应时间，5min；N：细胞数量，以万计；10^9：单位换算系数，1mol=10^9nmol。

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)，所以在测定样本蛋白浓度时需要减去提取液本身的蛋白含量。

实验实例：

1. 取0.1g月季花朵加入1mL试剂一进行冰浴匀浆，10000rpm，4℃离心10min，取上清置冰上，按照测定步骤操作，测得计算ΔA=(A2测定-A1测定)-(A2空白-A1空白)=(0.763-0.716)-(0.082-0.064)=0.029，按样本质量计算酶活得：

   TrxR活性(U/g质量)=147×ΔA÷W=42.63 U/g 质量。
2. 取0.1g小鼠肝脏样本加入1mL试剂一进行冰浴匀浆，10000rpm，4℃离心10min，取上清稀释2倍置冰上，按照测定步骤操作，测得计算ΔA=(A2测定-A1测定)-(A2空白-A1空白)=(1.508-0.4)-(0.082-0.064)=1.09，按样本质量计算酶活得：

   TrxR(U/g质量)=147×ΔA÷W×2(稀释倍数)=3204.6U/g 质量。