

硫氧还蛋白氧化还原酶 (TrxR) 活性检测试剂盒 (可见分光光度法)

产品货号: BA1190

产品规格: 100管/96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 90mL×1 瓶	4℃
试剂二	液体 6mL×1 瓶	4℃
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: 临用前取 1 瓶加入 3mL 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:

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、蒸馏水、无水乙醇。

操作步骤:

一、样品处理 (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 后置冰上。

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. 试剂一在 25℃ (一般物种) 或者 37℃ (哺乳动物) 预热 30min。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

- 空白管：取 1mL 玻璃比色皿，加入 100 μ L 试剂二，100 μ L 试剂三，800 μ L 试剂一，迅速混匀后于 412nm 测定 10s 时吸光度，然后将比色皿放入 37 $^{\circ}$ C 水浴 5min 后混匀立即测定 310s 吸光度，记为 A1 和 A2。 ΔA 空白管=A2-A1。
- 测定管：取 1mL 玻璃比色皿，加入 100 μ L 试剂二，100 μ L 试剂三，700 μ L 试剂一，100 μ L 上清液，迅速混匀后于 412nm 测定 10s 时吸光度，然后将比色皿放入 37 $^{\circ}$ C 水浴 5min 后混匀立即测定 310s 吸光度，记为 A3 和 A4。 ΔA 测定管=A4-A3。

三、TrxR活性计算

(1) 按蛋白浓度计算

活性单位定义：在 25 $^{\circ}$ C 或者 37 $^{\circ}$ C 中，每毫克蛋白每分钟生成 1nmol TNB 为一个酶活力单位。

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

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：在 25 $^{\circ}$ C 或者 37 $^{\circ}$ C 中，每克样本每分钟生成 1nmol TNB 为一个酶活力单位。

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

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：在 25 $^{\circ}$ C 或者 37 $^{\circ}$ C 中，每 10⁴ 个细胞每分钟生成 1nmol TNB 为一个酶活力单位。

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

ϵ : TNB 在 412nm 处的摩尔消光系数, 1.36 $\times 10^4$ L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 1000 μ L=0.001L; 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, 100 μ L=0.1mL; T: 反应时间, 5min; W: 样本质量, g; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1mL; 细胞数量: 以 10⁴ 为单位, 以万计。

注意事项:

- 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。
- 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

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com