

硫氧还蛋白还原酶(TrxR)检测试剂盒(微量法)

产品货号: BA3204

产品规格: 100T/96S

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。

试剂盒组分:

试剂名称	规格	保存要求
试剂一	液体125mL×1瓶	2-8°C
试剂二	液体3mL×1瓶	2-8°C
试剂三	粉剂×2支	-20°C
试剂四	液体30μL×1支	-20°C

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°C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/酶标仪、低温离心机、可调节移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、封板膜、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, 4°C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),冰浴超声破碎细胞(功率300w,超声3s,间隔7s,总时间3min),然后10000rpm, 4°C,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. 分光光度计或酶标仪预热30min后,调节波长到412nm,分光光度计用蒸馏水调零。
2. 试剂一37°C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°C水浴30min后置冰上。
4. 操作表: (在微量玻璃比色皿/96孔板中加入下列试剂)

试剂名称(μL)	测定管	空白管
试剂二	20	20
试剂三	20	20
试剂一	140	160
样本混合物	20	-

将上述试剂分别加入微量玻璃比色皿/96孔板后迅速吹打混匀,记录第10s时



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

412nm的吸光值A1测定(A1空白), 迅速置于37°C水浴或培养箱5min(酶标仪有控温功能的可以调节温度至37°C), 拿出迅速擦干测定5min10s时的吸光值A2测定(A2空白), 计算 $\Delta A=(A2\text{测定}-A1\text{测定})-(A2\text{空白}-A1\text{空白})$ 。空白管只需测1-2次。

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37°C条件下, 每毫克蛋白每分钟生成1nmolTNB为一个酶活力单位。

$$\text{TrxR活性(U/mg prot)}=\Delta A\div(\epsilon\times d)\times 10^9\times V\text{反总}\div(\text{Cpr}\times V\text{样})\div T=147\times\Delta A\div\text{Cpr}$$

2) 按样本质量计算

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

$$\text{TrxR活性(U/g 质量)}=\Delta A\div(\epsilon\times d)\times 10^9\times V\text{反总}\div(V\text{样}\div V\text{样总}\times W)\div T=147\times\Delta A\div W$$

3) 按细胞数量计算

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

$$\text{TrxR活性(U/10}^4\text{cell)}=\Delta A\div(\epsilon\times d)\times 10^9\times V\text{反总}\div(N\times V\text{样}\div V\text{样总})\div T=147\times\Delta A\div N$$

4) 按液体体积计算:

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

$$\text{TrxR活性(U/mL)}=\Delta A\div(\epsilon\times d)\times 10^9\times V\text{样本}\div V\text{样}\div T=147\times\Delta A$$

ϵ : TNB在412nm处的摩尔消光系数, $1.36\times 10^4\text{L/mol/cm}$; d: 比色皿光径, 1cm; V反总: 反应体系总体积, $200\mu\text{L}=2\times 10^{-4}\text{L}$;
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, $20\mu\text{L}=0.02\text{mL}$;
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, $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ 。

b. 使用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37°C条件下, 每毫克蛋白每分钟生成1nmolTNB为一个酶活力单位。

$$\text{TrxR活性(U/mg prot)}=\Delta A\div(\epsilon\times d)\times 10^9\times V\text{反总}\div(\text{Cpr}\times V\text{样})\div T=245\times\Delta A\div\text{Cpr}$$

2) 按样本质量计算

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

$$\text{TrxR活性(U/g 质量)}=\Delta A\div(\epsilon\times d)\times 10^9\times V\text{反总}\div(V\text{样}\div V\text{样总}\times W)\div T=245\times\Delta A\div W$$

3) 按细胞数量计算

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

$$\text{TrxR活性(U/10}^4\text{cell)}=\Delta A\div(\epsilon\times d)\times 10^9\times V\text{反总}\div(N\times V\text{样}\div V\text{样总})\div T=245\times\Delta A\div N$$

ϵ : TNB在412nm处的摩尔消光系数, $1.36\times 10^4\text{L/mol/cm}$; d: 比色皿光径, 0.6cm; V反总: 反应体系总体积, $200\mu\text{L}=2\times 10^{-4}\text{L}$;
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, $20\mu\text{L}=0.02\text{mL}$;
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, $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ 。

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°C离心10min, 取上清置冰上, 按照测定步骤操作, 用微量玻璃比色皿测得计算 $\Delta A=(A2\text{测定}-A1\text{测定})-(A2\text{空白}-A1\text{空白})=(0.8600-0.8177)-(0.0792-0.0727)=0.00358$, 按样本质量计算酶活得:
 $\text{TrxR活性(U/g质量)}=147\times\Delta A\div W=53.626\text{ U/g 质量}$ 。
2. 取0.1g小鼠肝脏样本加入1mL试剂一进行冰浴匀浆, 10000rpm, 4°C离心10min, 取上清稀释4倍置冰上, 按照测定步骤操作, 用微量玻璃比色皿测得计算 $\Delta A=(A2\text{测定}-A1\text{测定})-(A2\text{空白}-A1\text{空白})=(0.8538-0.2101)-(0.0792-0.0727)=0.6372$, 按样本质量计算酶活得:
 $\text{TrxR(U/g质量)}=147\times\Delta A\div W\times 4(\text{稀释倍数})=3746.736\text{ U/g 质量}$ 。



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