

## 硫氧还蛋白还原酶（thioredoxin reductase, TrxR）活性试剂盒说明书

（货号：BP10230F 分光法 48 样 有效期：3 个月）

### 一、指标介绍：

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<sup>+</sup>，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：

| 试剂组分 | 试剂规格        | 存放温度   | 注意事项                                                                          |
|------|-------------|--------|-------------------------------------------------------------------------------|
| 提取液  | 液体 60mL×1 瓶 | 4℃保存   |                                                                               |
| 试剂一  | 粉剂 2 支      | 4℃保存   | 每支：<br>1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底；<br>2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解；溶解后-20℃保存 2 周。 |
| 试剂二  | 液体 30mL×1 瓶 | 4℃保存   |                                                                               |
| 试剂三  | 液体 2mL×1 支  | 4℃避光保存 | 1. 固体出现可以 25℃水浴 5min, 使其呈液体状态；<br>2. 保存周期与试剂盒有效期相同。                           |

### 三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

### 四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

#### 1、样本提取

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（10<sup>4</sup>）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

#### 2、检测步骤

① 分光光度计预热 30 min，设置温度在 25℃，设定波长到 412 nm，蒸馏水调零。

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 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

|          |     |
|----------|-----|
| 试剂组分（μL） | 测定管 |
| 样本       | 80  |

|                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------|-----|
| 试剂一                                                                        | 40  |
| 试剂二                                                                        | 580 |
| 试剂三                                                                        | 40  |
| 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 $\Delta A$ 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 100 $\mu$ 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°C 下，每毫克蛋白每分钟还原 1nmol DTNB 生成 TNB 为一个酶活单位。

$$\text{TrxR 酶活}(\text{nmol/min/mg prot}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V2) \div (Cpr \times V1) \div T \times D = 68 \times \Delta A \div Cpr \times D$$

### 2、按样本质量计算：

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

$$\text{TrxR 酶活}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V2) \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 68 \times \Delta A \div W \times D$$

### 3、按细胞/细菌数量计算：

酶活定义：在 25°C 下，每 10<sup>4</sup> 个细胞/细菌样本每分钟还原 1nmol DTNB 生成 TNB 为 1 个酶活单位。

$$\text{TrxR 酶活}(\text{nmol/min/10}^4 \text{ cell}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \times 10^9 \times V2) \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D = 0.14 \times \Delta A \times D$$

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

d---光径，1cm；

W---样本质量，g；

V---提取液体积，1 mL；

V1---样本体积，80 $\mu$ L = 0.08mL；

V2---反应体系总体积，740 $\mu$ L = 7.4 $\times 10^{-4}$  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；