



硫氧还蛋白还原酶 (TrxR) 活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC1150

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 100 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 6 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂三	粉剂×2 瓶	-20°C保存
试剂四	液体 30μL×1 支	-20°C保存

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 3.33 mL 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。

产品说明：

TrxR (EC, EC 1.8.1.9) 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。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。

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。

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），冰浴超声波破碎细胞（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. 分光光度计预热 30min 后，调节波长到 412nm，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
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°C 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 $\Delta A = (A2 \text{ 测定} - A1 \text{ 测定}) - (A2 \text{ 空白} - A1 \text{ 空白})$ 。

空白管只需测 1-2 次。

三、TrxR 活性计算

(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 1nmol TNB 为一个酶活力单位。

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

(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 1nmol TNB 为一个酶活力单位。

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

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：在 37°C 条件下，每 10⁴ 个细胞每分钟生成 1nmol TNB 为一个酶活力单位。

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

(4) 按液体体积计算：

活性单位定义：在 37°C 条件下，每 10⁴ 个细胞每分钟生成 1nmol TNB 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; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $1000\mu\text{L} = 0.001\text{L}$; 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, $100\mu\text{L} = 0.1\text{mL}$; T : 反应时间, 5min; W : 样本质量, g; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1mL; 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℃离心 10min，取上清置冰上，按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A = (A2 \text{ 测定} - A1 \text{ 测定}) - (A2 \text{ 空白} - A1 \text{ 空白}) = (0.763 - 0.716) - (0.082 - 0.064) = 0.029$ ，按样本质量计算酶活得：

$$\text{TrxR (U/g 质量)} = 147 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W = 42.63 \text{ U/g 质量。}$$

2、取 0.1g 小鼠肝脏组织加入 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 $\Delta A = (A2 \text{ 测定} - A1 \text{ 测定}) - (A2 \text{ 空白} - A1 \text{ 空白}) = (1.508 - 0.4) - (0.082 - 0.064) = 1.09$ ，按样本质量计算酶活得：

$$\text{TrxR (U/g 质量)} = 147 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W \times 2 \text{ (稀释倍数)} = 3204.6 \text{ U/g 质量。}$$

相关发表文献：

[1] Li B, Li D, Jing W, et al. Biogenic selenium and its hepatoprotective activity[J]. Scientific reports, 2017, 7(1): 1-11.

[2] Zhang L, Fan J, He J, et al. Regulation of ROS–NF-κB axis by tuna backbone derived peptide ameliorates inflammation in necrotizing enterocolitis[J]. Journal of cellular physiology, 2019, 234(8): 14330-14338.

相关系列产品：

BC1170/ BC1175 还原型谷胱甘肽（GSH）含量检测试剂盒

BC1180/ BC1185 氧化型谷胱甘肽（GSSG）含量检测试剂盒

BC1190/ BC1195 谷胱甘肽过氧化物酶（GPX）活性检测试剂盒

BC0350/ BC0355 谷胱甘肽 S-转移酶（GST）活性检测试剂盒