

## 硫氧还蛋白氧化还原酶 (TrxR) 检测试剂盒 (微量法)

**注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。**

### 测定意义：

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。

### 测定原理：

TrxR 催化 NADPH 还原 DTNB 生成 TNB 和 NADP<sup>+</sup>，TNB 在 412 nm 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。

### 试剂组成和配制：

试剂一：液体 120mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 2mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂三：粉剂×1 管，4℃ 保存。临用前加入 2mL 蒸馏水溶解。

### 粗酶液提取：

- 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。8000g，4℃ 离心 10min，取上清置冰上待测。
- 2. 细菌、真菌：**按照细胞数量 (10<sup>4</sup> 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 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 8000g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。
- 3. 血清等液体：**直接测定。

### TrxR 测定步骤：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min，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。
3. **空白管：**取微量玻璃比色皿或 96 孔板，加入 20μL 试剂二，20μL 试剂三，160μL 试剂一，迅速混匀后于 412 nm 测定 10 s 和 310 s 吸光度，记为 A1 和 A2。ΔA 空白管=A2-A1。
4. **测定管：**取微量玻璃比色皿或 96 孔板，加入 20μL 试剂二，20μL 试剂三，140μL 试剂一，20μL 上清液，迅速混匀后于 412 nm 测定 10 s 和 310 s 吸光度，记为 A3 和 A4。ΔA 测定管=A4-A3。

**注意：空白管只需测定一次。**

### TrxR 活性计算公式：

- (1). 按蛋白浓度计算

活性单位定义：在 25℃ 或者 37℃ 中，每毫克蛋白每分钟催化 1nmol DTNB 还原为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{TrxR (nmol/min /mg prot)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T \\ &= 147 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

- (2). 按样本质量计算

活性单位定义：在 25℃ 或者 37℃ 中，每克样本每分钟催化 1nmol DTNB 还原为 1 个酶活单位。

$$\text{TrxR (nmol/min /g 鲜重)} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$

$$= 147 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：在 25°C 或者 37°C 中，每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟催化 1nmol DTNB 还原为 1 个酶活单位。

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

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：在 25°C 或者 37°C 中，每毫升液体每分钟催化 1nmol DTNB 还原为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{TrxR (nmol/min/mL)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样} \div T \\ &= 147 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \end{aligned}$$

$\epsilon$ : TNB 在 412nm 处的微摩尔消光系数, 0.0136 L/ $\mu$  mol/cm;       $d$ : 比色皿光径, 1cm;

$V$  反总: 反应体系总体积 (L), 200 $\mu$ L=2 $\times$ 10<sup>-4</sup> L;

$C_{pr}$ : 上清液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定;

$W$ : 样品质量;

$V$  样: 加入反应体系中上清液体积 (mL), 20 $\mu$ L=0.02 mL;

$V$  样总: 提取液体积, 1 mL;

$T$ : 反应时间 (min), 5 min.

**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 25°C 或者 37°C 中，每毫克蛋白每分钟催化 1nmol DTNB 还原为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{TrxR (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div (C_{pr} \times V \text{ 样}) \div T \\ &= 294 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div C_{pr} \end{aligned}$$

(2). 按样本质量计算

活性单位定义：在 25°C 或者 37°C 中，每克样本每分钟催化 1nmol DTNB 还原为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{TrxR (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 294 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W \end{aligned}$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：在 25°C 或者 37°C 中，每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟催化 1nmol DTNB 还原为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{TrxR (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 294 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：在 25°C 或者 37°C 中，每毫升液体每分钟催化 1nmol DTNB 还原为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{TrxR (nmol/min/mL)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样} \div T \\ &= 294 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \end{aligned}$$

$\epsilon$ : TNB 在 412nm 处的微摩尔消光系数, 0.0136 L/ $\mu$  mol/cm;       $d$ : 96 孔板光径, 0.5cm;

$V$  反总: 反应体系总体积 (L), 200 $\mu$ L=2 $\times$ 10<sup>-4</sup> L;

$C_{pr}$ : 上清液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定;

$W$ : 样品质量;

$V$  样: 加入反应体系中上清液体积 (mL), 20 $\mu$ L=0.02 mL;

$V$  样总: 提取液体积, 1 mL;

$T$ : 反应时间 (min), 5 min.

**注意事项:**

1. 测定前须先取 1~2 个样做预实验，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. 试剂二和试剂三配制好后 3 天内使用完。