

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

（货号：ADS-F-FM028 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⁺，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： 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 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； 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（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、检测步骤

① 可见分光光度计预热 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 ΔA 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 μ 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。

TrxR 酶活(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。

TrxR 酶活(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 10⁴ 个细胞/细菌样本每分钟还原 1nmol DTNB 生成 TNB 为 1 个酶活单位。

TrxR 酶活(nmol/min/10⁴ 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

ϵ ---TNB 摩尔消光系数，1.36 $\times$ 10⁴ 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 μ L=0.08mL；

V2---反应体系总体积，740 μ 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；