

硫氧还蛋白氧化还原酶活性测定试剂盒

(货号: BC047 分光光度法 50T/48 样)

一、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。

二、测定原理

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。

三、自备实验用品及仪器

可见分光光度计、低温离心机、可调节移液器、1mL玻璃比色皿(1cm光径)、蒸馏水、蛋白浓度测定试剂盒(组织或细胞样本用,本公司有售)。

四、试剂组成和配制(试剂盒有效期3个月)

试剂一:液体×1瓶,4℃保存。

试剂二:液体×1瓶,4℃避光保存。

试剂三:粉剂×1瓶,4℃保存。临用前加入5mL蒸馏水溶解。

五、粗酶液提取

1. 组织:按照组织质量(g):提取液体体积(mL) 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(10⁴个):提取液体体积(mL) 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(浆)等液体样本:直接使用。

六、操作步骤

1. 分光光度计预热30min后,调节波长到412nm,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:取试管或离心管,加入100μL蒸馏水,100μL试剂二,100μL试剂三,700μL试剂一,迅速混匀后倒入1mL容量比色皿中,于波长412nm处,分光光度计测定10s和310s吸光度,记为A1和A2。ΔA空白管=A2-A1。(空白管只需做1管)
4. 测定管:取另一干净试管或离心管,加入100μL试剂二,100μL试剂三,700μL试剂一,100μL上清液(或血清(浆)),迅速混匀后倒入1mL容量比色皿中,于波长412nm处,分光光度计测定10s和310s吸光度,记为A3和A4。ΔA测定管=A4-A3。

七、计算公式

1、组织、细菌或细胞中TrxR活力计算

(1)、按蛋白质浓度计算

单位(U)定义:在25℃或者37℃中每毫克组织蛋白每分钟催化1nmolDTNB还原定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{TrxR活力 (U/mgprot)} &= \frac{\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\epsilon \times d} \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}} \times \text{Cpr}} \div T \\ &= 147 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2)、按样本重量计算

单位 (U) 定义: 在25°C或者37°C中, 每克样本每分钟催化1nmolDTNB还原定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{TrxR 活力 (U/g鲜重)} &= \frac{\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\epsilon \times d} \times \frac{V_{\text{反总}}}{V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}} \div T \\ &= 147 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W\end{aligned}$$

(3)、按细胞数量计算

单位 (U) 定义: 在25°C或者37°C中, 每10⁴个细胞每分钟催化1nmolDTNB还原定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{TrxR 活力 (U/10}^4\text{ cells)} &= \frac{\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\epsilon \times d} \times \frac{V_{\text{反总}}}{V_{\text{样}} \times \text{细胞数} \div V_{\text{样总}}} \div T \\ &= 147 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div \text{细胞数}\end{aligned}$$

2、液体样本计算

单位 (U) 定义: 在25°C或者37°C中, 每mL样本每分钟催化1nmol DTNB还原定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{TrxR 活力 (U/mL)} &= \frac{\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\epsilon \times d} \times \frac{V_{\text{反总}}}{V_{\text{样}}} \div T \\ &= 147 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})\end{aligned}$$

ϵ : TNB在412nm处的微摩尔消光系数, 0.0136L/μmol/cm;

d : 比色皿光径, 1cm;

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积 (L), 1000μL=0.001L;

C_{pr} : 上清液蛋白质浓度 (mg/mL);

$V_{\text{样}}$: 加入反应体系中样本体积 (mL), 100μL=0.1mL;

$V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL;

W : 样本质量, g;

T : 反应时间, 5min。

八、注意事项

1、测定前须先取1~2个样做预实验, 使得吸光值在5min内成线性变化。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、试剂三配好后尽快用完 (建议 3 天内)。