



硫氧还蛋白还原酶 (TrxR) 活性检测试剂盒  
Thioredoxin Reductase (TrxR) Activity Assay Kit

**5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoic Acid  
(DTNB)**



**2-Nitro-5-Mercaptobenzoic Acid  
(TNB)**

北京盒子生工科技有限公司  
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



## 硫氧还蛋白还原酶 (TrxR) 活性检测试剂盒

### Thioredoxin Reductase (TrxR) Activity Assay Kit

#### 一、产品描述

硫氧还蛋白还原酶 (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, 能够催化 GSSG 还原生成 GSH, 是谷胱甘肽氧化还原循环关键酶之一。

硫氧还蛋白还原酶能够催化 NADPH 还原 DTNB 生成 TNB 和 NADP<sup>+</sup>, 并利用 2-乙烯吡啶抑制还原型谷胱甘肽与 DTNB 反应生成的 TNB, TNB 在 412 nm 处具有特征吸收峰, 通过测定 412 nm 处吸光值增加速率即可表征硫氧还蛋白还原酶的活性。

#### 二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用说明及注意事项
试剂一	液体 125 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂二	液体 3 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂三	粉剂×2 支	-20°C保存	使用每支前加入 1.667 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存 1 周, 避免反复冻融)
试剂四	液体 30 μL×1 支	-20°C保存	-
<b>检测工作液的配制 (现用现配):</b> 根据使用量按照试剂四: 无水乙醇=1:9 的体积比配制, 充分混匀即为检测工作液。			

需自备试剂: 无水乙醇 (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O, MW = 46.07, CAS: 64-17-5);

#### 三、产品使用说明

**测定过程中所需要的仪器和试剂:** 可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿 (光径 10 mm) /96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱、无水乙醇和蒸馏水。

##### 1. 粗酶液的制备 (可根据预实验结果适当调整样本量及比例)

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 0.1 g 组织, 加入 1 mL 试剂一) 处理样品, 4°C 10000 g 离心 10 min, 吸取 100 μL 上清液加入 2 μL 检测工作液充分混匀, 37°C 水浴 30 min 即为粗酶液, 置于冰上待测。

②细菌或细胞:离心收集细菌或细胞至离心管内,按照细菌或细胞数量( $10^4$ 个):试剂一体积(mL)为(500-1000):1的比例(建议500万细菌或细胞加入1 mL试剂一)处理样品,冰浴超声破碎(功率300 W,超声3 s,间隔7 s,总时间3 min), $4^{\circ}\text{C}$  10000 g离心10 min,吸取100  $\mu\text{L}$ 上清液加入2  $\mu\text{L}$ 检测工作液充分混匀, $37^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min即为粗酶液,置于冰上待测。

## 2.测定步骤

- ①分光光度计或酶标仪预热30 min以上,调节波长至412 nm,蒸馏水调零。
- ②试验前将试剂一 $37^{\circ}\text{C}$ (哺乳动物)或 $25^{\circ}\text{C}$ (其它物种)预热30 min。
- ③在96孔板或微量玻璃比色皿中依次加入下列试剂:

试剂	测定组 ( $\mu\text{L}$ )	空白组 ( $\mu\text{L}$ )
试剂二	20	20
试剂三	20	20
试剂一	140	160
粗酶液	20	-

**吸光值测定:** ①充分混匀并立即开始计时,测定10 s(总时间)时412 nm处吸光值,记为A1测定和A1空白; ② $37^{\circ}\text{C}$ 准确反应300 s,测定310 s(总时间)时412 nm处吸光值,记为A2测定和A2空白; ③计算 $\Delta A$ 测定=A2测定-A1测定,  $\Delta A$ 空白=A2空白-A1空白,  $\Delta A = \Delta A$ 测定- $\Delta A$ 空白。注:空白组只需测定1-2次。

## 3.硫氧还蛋白还原酶(TrxR)活性计算

### 3.1 使用96孔板测定的计算公式

- ①按组织蛋白浓度计算

单位定义:每mg组织蛋白每分钟生成1 nmol TNB所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{TrxR (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times \text{Cpr} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{294 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

- ②按组织样本质量计算

单位定义:每g组织样本每分钟生成1 nmol TNB所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{TrxR (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{294 \times \Delta A}{W}$$

### ③按细胞或细胞数量计算

单位定义：每  $10^4$  个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol TNB 所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{TrxR (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\varepsilon \times d_1 \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{294 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

## 3.2 使用微量玻璃比色皿测定的计算公式

### ①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol TNB 所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{TrxR (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\varepsilon \times d_2 \times \text{Cpr} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{147 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

### ②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织样本每分钟生成 1 nmol TNB 所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{TrxR (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\varepsilon \times d_2 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{147 \times \Delta A}{W}$$

### ③按细胞或细胞数量计算

单位定义：每  $10^4$  个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol TNB 所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{TrxR (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\varepsilon \times d_2 \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{147 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

**注释：** V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，20  $\mu\text{L}$ =0.02 mL；V 反总：反应体系总体积，200  $\mu\text{L}$ = $2 \times 10^{-4}$  L；V 样总：粗酶液总体积，1 mL； $\varepsilon$ ：TNB 摩尔消光系数， $1.36 \times 10^4$  L/mol/cm； $d_1$ ：96 孔板光径，0.5 cm； $d_2$ ：微量玻璃比色皿光径，1 cm；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计；T：反应时间，5 min。

## 四、注意事项

①试剂一中含有约 0.1 mg/mL 蛋白，测定样品蛋白浓度时需减去提取液自身的蛋白含量；

②准确在 10 s 和 310 s 处完成吸光值测定，以确保试验结果的准确性和重复性；若使用 96 孔板测定应使用多道移液器，且分批进行测定，以确保组间反应时间一致；

③为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

**For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.**

