CheKine™ 硫氧还蛋白还原酶（TrxR）检测试剂盒（微量法）

货号: KTB1650　　规格: 48 T/48 S　96 T/96 S　　批号：见产品标签

	适用样本：动物组织、细胞、细菌、血清（浆）
	保质期：-20℃，避光保存 12 个月

01 背景与原理

硫氧还蛋白还原酶（Thioredoxin Reductase, TrxR）是一种 NADPH 依赖的二聚体硒酶，包含 FAD 结构域，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。CheKine™ 硫氧还蛋白还原酶（TrxR）检测试剂盒提供了一种简单的检测方法检测生物样本，如血清（浆）、动物组织、细胞及细菌样本中 TrxR 的活性。

本试剂盒检测原理是 TrxR 催化 NADPH 还原 DTNB 生成 TNB 和 NADP+，TNB 在 412 nm 有特征吸收峰，但还原型谷胱甘肽与 DTNB 同样能反应生成 TNB，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 412 nm 波长处 TNB 的增加速率，即可计算 TrxR 活性。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Assay Buffer	70 mL	70 mL×2	4℃
Chromogen	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃，保存避光
TrxR Cofactor	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃，保存避光
Inhibitor	60 μL	120 μL	-20℃，保存避光

***请在实验前检查各组分的量。**

***各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。**

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 412 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	去离子水/PBS	样本稀释用/样本清洗用
其他	匀浆器（组织样本）、恒温水浴锅、低温离心机、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- **正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验,使得吸光值在 5 min 内呈线性变化。**
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，**请在实验全程做好生物安全防护**，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Assay Buffer	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Working Chromogen	临用前配制，Chromogen 加入 3 mL 去离子水溶解	用不完的试剂 4℃避光保存可稳定 2 周；**Chromogen 有一定的刺激性，建议在使用过程中做好个人防护**
Working TrxR Cofactor	临用前配制，TrxR Cofactor 加入 5 mL 去离子水溶解	用不完的试剂-20℃避光分装保存 2 周，避免反复冻融
Inhibitor	即用型；使用前，避光平衡到室温	-20℃避光保存；**Inhibitor 有一定的刺激性，建议在使用过程中做好个人防护**

05-2 样本制备

注意：样品处理等过程均需要在冰上进行，且须在当日测定酶活力。推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存一个月。细胞中 TrxR 活性测定时，细胞数目须在 3-5×10^6 之间，提取细胞中 TrxR 时可加 Assay Buffer 后研磨或超声波处理，不能用细胞裂解液处理细胞。

- **动物组织**：称取约 0.1 g 组织，加入 1 mL 预冷的 Assay Buffer，冰浴匀浆，10000 g，4℃离心 10 min，取上清液，置冰上待测。
- **细胞或细菌**：收集 5×10^6 个细胞或细菌，用预冷的 PBS 清洗细胞或细菌，800 g 离心 2 min，弃上清。加入 1 mL Assay Buffer 进行冰浴超声破碎。超声波破碎 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），4℃，10000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

- **血清（浆）**：直接测定。

05-3 实验步骤

注意：哺乳动物组织 TrxR 活力测定时，一般须用去离子水稀释 5 倍左右；测定过程操作须迅速。由于 Assay Buffer 中含有一定浓度的蛋白（约 0.1 mg/mL），所以在测定样品蛋白浓度时需要减去 Assay Buffer 本身的蛋白含量。

1. 酶标仪准备：预热 30 min 以上，调节波长到 412 nm。Assay Buffer 置于 25℃（一般物种）或者 37℃（哺乳动物）孵育 30 min。

2. 检测体系配制：空白孔只需做 1 个即可。在 96 孔板中按照如下方式操作：

试剂	空白孔（μL）	测定孔（μL）
Assay Buffer	20	0
Sample	0	20
Inhibitor	1	1
混匀，在 25℃（一般物种）或者 37℃（哺乳动物）孵育 30 min		
Assay Buffer	140	140
Working Chromogen	20	20
Working TrxR Cofactor	20	20

3. 吸光度检测：迅速混匀，立即测定 412 nm 处第 10 s 时吸光度为 A_1，置于 25℃（一般物种）或者 37℃（哺乳动物）孵育 5 min，记录第 5 min 10 s 时吸光值为 A_2。测定孔记为 $A_{测定}$，空白孔记为 $A_{空白}$。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧**二维码**或访问官网[https://www.abbkine.cn] > 进入“**技术中心**”> 查找“**在线计算器**”**工具**。

06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算$\Delta A=A_2-A_1$，$\Delta A_{测定}=A_{2\,测定}-A_{1\,测定}$，$\Delta A_{空白}=A_{2\,空白}-A_{1\,空白}$，$\Delta\Delta A=\Delta A_{测定}-\Delta A_{空白}$

2. 样本 TrxR 活性计算

- 按样本蛋白浓度计算

活性单位（U）定义：在 25℃或者 37℃中，每毫克蛋白每分钟催化 1 μmol DTNB 还原。

$TrxR\ (U/mg\ prot)=\Delta\Delta A\div(\varepsilon\times d)\times V_{反总}\div(Cpr\times V_{样})\div T=\mathbf{0.294\times\Delta\Delta A\div Cpr}$

- 按样本鲜重计算

活性单位（U）定义：在 25℃或者 37℃中，每克样品每分钟催化 1 μmol DTNB 还原。

$TrxR\ (U/g)=\Delta\Delta A\div(\varepsilon\times d)\times V_{反总}\div(V_{样}\div V_{样总}\times W)\div T=\mathbf{0.294\times\Delta\Delta A\div W}$

- 按细胞或细菌密度计算

活性单位（U）定义：在 25℃或者 37℃中，每 10^4 个细胞或细菌每分钟催化 1 μmol DTNB 还原。

$TrxR\ (U/10^4)=\Delta\Delta A\div(\varepsilon\times d)\times V_{反总}\div(N\times V_{样}\div V_{样总})\div T=\mathbf{0.294\times\Delta\Delta A\div N}$

- 按样本体积计算

活性单位（U）定义：在 25℃或者 37℃中，每毫升液体每分钟催化 1 μmol DTNB 还原。

$TrxR\ (U/mL)=\Delta\Delta A\div(\varepsilon\times d)\times V_{反总}\div V_{样}\div T=\mathbf{0.294\times\Delta\Delta A}$

ε：产物微摩尔消光系数，0.0136 L/μmol/cm；d：96 孔板光径，0.5 cm；$V_{反总}$：反应体系总体积，200 μL=2×10^{-4} L；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；W：样品质量，g；$V_{样}$：加入反应体系中上清液体积，20 μL=0.02 mL；$V_{样总}$：提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；N：细胞或细菌数量，以 10^4 为单位（例如细胞数量为 5×10^6，N=500）。

07 结果展示

示例-1：取 0.1 g 小鼠肝脏，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得$\Delta A_{空白}=A_2-A_1=0$，$\Delta A_{测定}=A_{2\,测定}-A_{1\,测定}$ =1.772-1.109=0.663。按样本质量计算得：TrxR (U/g)=0.294×ΔΔA÷W=1.949 U/g。
示例-2：取 0.1 g 小鼠肾脏，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得$\Delta A_{空白}=A_2-A_1=0$，$\Delta A_{测定}=A_{2\,测定}-A_{1\,测定}$ =1.494-0.954=0.540。按样本质量计算得：TrxR (U/g)=0.294×ΔΔA÷W=1.588 U/g。

08 FAQ

- **检测得到的样本ΔΔA 过高或者过低怎么办?**

如果ΔΔA 小于 0.02 可适当加大样本量。如果ΔΔA 大于 1.0，样本可用 Assay Buffer 进一步稀释，或减少提取用样本量，再重新进行测定。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1600	CheKine™ 还原型谷胱甘肽（GSH）检测试剂盒（微量法）
KTB1610	CheKine™ 氧化型谷胱甘肽（GSSG）检测试剂盒（微量法）
KTB1620	CheKine™ 谷胱甘肽还原酶（GR）检测试剂盒（微量法）
KTB1630	CheKine™ 谷胱甘肽 S-转移酶（GST）检测试剂盒（微量法）
KTB1640	CheKine™ 谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）检测试剂盒（微量法）
KTB1660	CheKine™ 硫氧还蛋白过氧化物酶（TPX）检测试剂盒（微量法）

CheKine™ 硫氧还蛋白还原酶活性检测流程示意图

（Abbkine 货号 ： KTB1650）

