

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K548-M

产品规格: 48T(24 samples)/96T(48 samples)

检测仪器: 酶标仪(412nm)

Elabscience® 硫氧还蛋白还原酶(TrxR)比色法测试盒

Thioredoxin Reductase (TrxR) Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测动物组织及细胞样本中的硫氧还蛋白还原酶(TrxR)的活力。

检测原理

硫氧还蛋白系统作为机体内最重要的抗氧化系统之一，能够稳定生物体的氧化还原平衡，调控信号传导，与生物体内的细胞氧化还原反应、核酸代谢、细胞生长及肿瘤发生都有一定关系。硫氧还蛋白还原酶(TrxR)是一种NADPH依赖的包含黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)结构域的二聚体硒酶，是吡啶核苷酸—二硫化物氧化还原酶家族的一员。硫氧还蛋白系统由NADPH、硫氧还蛋白还原酶和硫氧还蛋白三部分组成。本试剂盒测定原理：TrxR催化底物使还原剂还原显色剂在412 nm有特征吸收峰。

本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用BCA法。(货号：E-BC-K318-M)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	25 mL×1 瓶	50 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 A (Substrate A)	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 B (Substrate B)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 (Chromogenic Agent)	0.25 mL×1 支	0.25 mL×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(最佳检测波长 412 nm)、37°C 恒温箱

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 试剂二工作液配制：

取一瓶试剂二加入3 mL试剂一，溶解混匀，未使用完的试剂可在-20°C保存2天。

③ 试剂三工作液配制：

取一支试剂三加入0.25 mL试剂一，溶解混匀，未使用完的试剂可在-20°C保存2天。

④ 测定工作液的配制：

将试剂一:试剂二工作液:试剂三工作液:试剂四按体积比=72: 25: 2: 1配制，现配现用，按需配制，避光待用。

⑤ 对照工作液的配制：

将试剂一:试剂四按体积比=99: 1配制，现配现用，按需配制，避光待用。

样本准备

① 样本处理

组织样本匀浆:按照组织样本质量(g):生理盐水(0.9%NaCl)体积(mL)=1:9的比例匀浆, 4°C, 10000 × g离心10 min, 取上清置于冰上待测, 留取部分上清进行蛋白浓度测定。

细胞样本:按照细胞个数(10^6):生理盐水(0.9%NaCl)体积(mL)=5:1的比例匀浆, 4°C, 10000 × g离心10 min, 取上清置于冰上待测, 留取部分上清进行蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前, 需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验, 根据预实验的结果, 结合本试剂盒的线性范围: 0.82-46.81 U/L, 请参考下表稀释(仅供参考):

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%小鼠肝组织	2-3	CHO 细胞	不稀释
10%小鼠肾组织	2-3	Hela 细胞	不稀释
10%小鼠肺组织	2-3	Jurkat 细胞	不稀释
HL-60 细胞	不稀释	Molt-4 细胞	不稀释

注: 稀释液为生理盐水(0.9 %NaCl)。

操作步骤

- ① 测定孔：取 10 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。
对照孔：取 10 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。
- ② 向步骤①中测定孔加入 190 μL 测定工作液，对照孔加入 190 μL 对照工作液。
- ③ 振板 5 s, 37°C 避光孵育 15 min 后于酶标仪 412 nm 波长下检测各孔 OD 值。

操作表

	测定孔	对照孔
待测样本(μL)	10	10
测定工作液(μL)	190	--
对照工作液(μL)	--	190
振板 5 s, 37°C 避光孵育 15 min 后于酶标仪 412 nm 波长下检测各孔 OD 值。		

本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法。(货号：E-BC-K318-M)。

结果计算

组织或细胞样本中硫氧还蛋白还原酶(TrxR)活力计算公式:

定义: 37°C 条件下, 每克组织或细胞蛋白每分钟催化底物产生 1 μmol 的产物所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{TrxR 活力 (U/gprot)} = \Delta A_{412} \div (\varepsilon \times d) \times (V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}}) \div T \times f \div C_{\text{pr}}$$

注解:

ΔA_{412} : 样本的变化 OD 值 ($\Delta A_{412} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$)

ε : 显色产物在 412nm 处的摩尔消光系数, $1.36 \times 10^{-2} \text{ L}/\mu\text{mol}/\text{cm}$

d: 96 孔板光径, 0.6 cm

$V_{\text{反总}}$: 反应的总体积, $200 \mu\text{L} = 0.2 \text{ mL}$

$V_{\text{样}}$: 加入反应体系中样本上清液的体积, $10 \mu\text{L} = 0.01 \text{ mL}$

C_{pr} : 加入检测体系前样本的蛋白浓度, gprot/L

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

T: 反应时间, 15 min

附录1 关键数据

1.技术参数

检测范围	0.82-46.81 U/L	批间差	3.2-5.3 %
灵敏度	0.82 U/L	批内差	1.5-2.9 %
回收率	95-98 %		

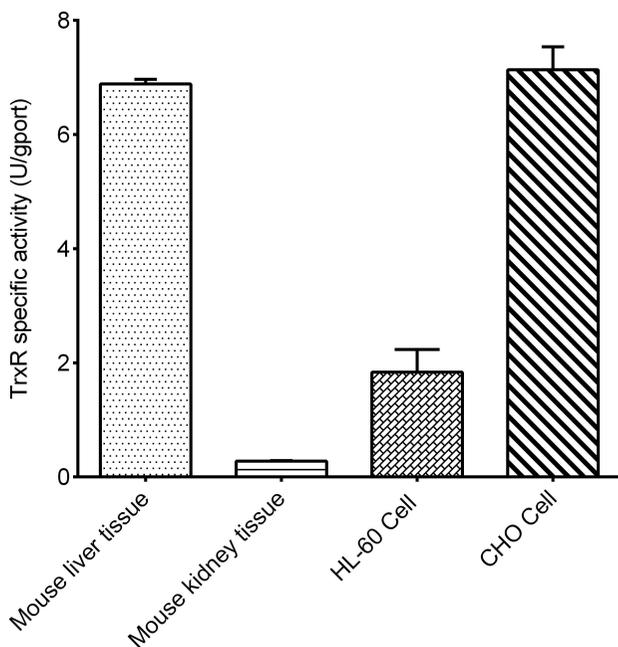
附录2 实例分析

例如小鼠肝组织(数据仅供参考):

取稀释2倍的10%小鼠肝组织匀浆10 μL 加入到酶标板孔中,按操作表操作,结果如下: 样本测定OD值为0.881, 样本对照OD值为0.310, $\Delta A_{412} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.881 - 0.310 = 0.571$, 测定出10%小鼠肝组织的蛋白含量为13.56 gprot/L 计算结果为:

$$\begin{aligned}\text{TrxR活力(U/gport)} &= 0.571 \div (1.36 \times 10^{-2} \times 0.6) \times (0.2 \div 0.01) \div 15 \times 2 \div 13.56 \\ &= 13.76 \text{ U/gport}\end{aligned}$$

按说明书操作,测定小鼠肝组织(10%组织匀浆的蛋白含量为13.56 gprot/L , 加样量10 μL)、小鼠肾组织(10%组织匀浆的蛋白含量为16.78 gprot/L , 加样量10 μL)、HL-60细胞(6.9×10^6 个, 蛋白含量1.28 gprot/L , 加样量10 μL)、CHO细胞(1.5×10^6 个, 蛋白含量0.191 gprot/L , 加样量10 μL)中的TrxR活力(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本测不出值	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本，重新检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等于于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

