



## 硫氧还蛋白还原酶检测试剂盒

## Thioredoxin Reductase Assay Kit

## 包装清单

Cat No.	组分	包装规格-100T
MCK-0055	测定缓冲液 5×	30mL 硫氧还蛋白还原酶
	硫氧还蛋白还原酶	50μL 蛋白质
	硫氧还蛋白还原酶	0.05mL 抑制剂溶液
	5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)	150mg 酸 (DTNB)
	NADPH	25mg
	二甲基亚砷 (DMSO)	7.5mL
	说明书	1 份

## 产品简介

硫氧还蛋白还原酶是一种普遍存在的酶，被认为参与许多细胞过程，如细胞生长、p53 活性和保护免受氧化应激。该酶可还原硫氧还蛋白以及非二硫化底物，如亚硝酸盐、硫辛酸、脂质氢氧化物和过氧化氢。

硫氧还蛋白还原酶检测试剂盒采用比色法测定硫氧还蛋白还原酶活性，其原理基于该酶的还原反应。5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸) (DTNB) 与 NADPH 反应生成 5-硫代-2-硝基苯甲酸 (TNB)，产生强烈的黄色，可在 412nm 处测量。

该试剂盒包含哺乳动物硫氧还蛋白还原酶检测所需的所有试剂，可轻松完成显色测定。试剂盒还特别配备抑制剂溶液，用于特异性抑制该酶活性。由于生物样本中存在多种可还原 DTNB 的酶，使用特异性抑制剂可确保检测结果仅反映硫氧还蛋白还原酶的活性对 DTNB 的还原作用。

该试剂盒已在哺乳动物组织（如肝脏、肾脏、大脑、脾脏和心肌）以及细胞系裂解液（如 HeLa、A549、Jurkat、U937、A431、硫化羧、CHO 和 NIH 3T3 细胞）中进行了测试。

该试剂盒足以进行 100 次 1 mL 检测。

## 保存条件

-20℃ 保存，有效期两年。DTNB 和 DMSO 的样本应保存于室温环境中。

## 注意事项

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 使用说明

## 准备工作：

1. 建议在制备试剂时使用超纯水（17 MΩ·cm 或等效水）。
2. 1×检测缓冲液（10 次反应用量）——取 2 毫升检测缓冲液，用超纯水按 1: 5 比例稀释，配制 10 毫升硫氧还蛋白还原酶专用缓冲液。将稀释后的 1×检测缓冲液置于室温保存。
3. DTNB 溶液制备：取 39.6 毫克 DTNB（5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)），溶于 1 毫升二甲基亚砷 (DMSO)。需提前一天配制，保存于 2-8℃。检测时溶液需置于室温环境。若需长期保存，可于 -20℃ 冷冻保存，最长可达 4 周。
4. NADPH 溶液-向装有 25 mg NADPH 的瓶中加入 0.625 mL 水。确保内容物完全溶解。
5. NADPH 溶液（40 mg/mL）可在 2-8℃ 下保存至检测结束，最长可达 5 小时。建议将未使用的 NADPH 溶液分装后，于 -20℃ 下保存最长 6 个月。
6. 工作缓冲液（适用于 10 次反应）制备方法：取 2 毫升 5×浓度测定缓冲液（硫氧还蛋白还原酶专用），加入 50 μL NADPH 溶液，用超纯水定容至 10 毫升。工作缓冲液终浓度为 100 mM 磷酸钾、10 mM EDTA 和 0.24 mM NADPH。保存于室温，2 小时内使用。
7. 稀释抑制剂溶液（用量充足）。



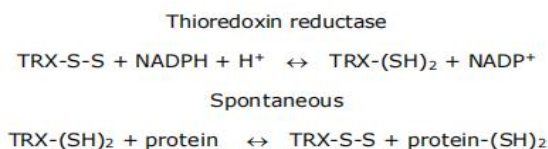
8. (5-10 反应体系) - 取 10  $\mu\text{L}$  硫氧还蛋白还原酶抑制剂溶液, 用二甲亚砜 (DMSO) 稀释 20 倍至 200  $\mu\text{L}$  终体积。反应过程中溶液需置于室温保存。稀释后的抑制剂溶液可于 -20 $^{\circ}\text{C}$  保存长达 4 周。向 1 mL 反应体系中加入 20  $\mu\text{L}$  稀释抑制剂溶液, 即可完全抑制硫氧还蛋白还原酶活性。

9. 硫氧还蛋白还原酶阳性对照: 取 5  $\mu\text{L}$  硫氧还蛋白还原酶, 用 1 $\times$ 测定缓冲液稀释 20 倍, 定容至 100  $\mu\text{L}$ 。该溶液可在 2-8 $^{\circ}\text{C}$  下保存至检测结束 (最长 2 小时)。取 10  $\mu\text{L}$  制备好的硫氧还蛋白还原酶溶液作为阳性对照。剩余的稀释酶溶液应丢弃。

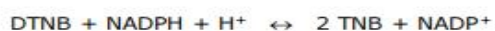
#### 操作步骤:

#### 说明:

1. 以下为硫氧还蛋白还原酶 (EC 1.6.4.5) 的体内还原反应, 硫氧还蛋白 (TRX) 为底物:



2. 哺乳动物硫氧还蛋白还原酶活性测定采用试剂盒, 以 DTNB 为底物: 2,3 硫氧还蛋白还原酶。



3. 每氧化 1 摩尔 NADPH, 可生成 2 摩尔 5-硫代-2-硝基苯甲酸 (TNB)。该检测在室温 (25 $^{\circ}\text{C}$ ) 下进行, TNB 在 412 纳米处具有最大吸收峰 (摩尔消光系数 [  $\epsilon\text{M}$  ] 为 14,150  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )。4 在粗制生物样本中, 其他酶活性 (如谷胱甘肽还原酶和谷胱甘肽过氧化物酶) 也会参与 DTNB 的还原反应, 从而提高观察到的 DTNB 还原速率。通过使用特异性硫氧还蛋白还原酶抑制剂, 可以估算这些酶活性对总 DTNB 还原的贡献。为了确定样本中硫氧还蛋白还原酶活性单独导致的 DTNB 还原量, 需要进行两项测定: 第一项是测定样本对总 DTNB 的还原量, 第二项是在硫氧还蛋白还原酶抑制剂溶液存在下测定样本对 DTNB 的还原量。两项结果的差值即为硫氧还蛋白还原酶活性导致的 DTNB 还原量。

4. 表 1 总结了使用比色皿测量 1 毫升反应的反应方案。该测定在室温 (25 $^{\circ}\text{C}$ ) 下进行。1 毫升反应中, 硫氧还蛋白还原酶活性的 0.005-0.10 单位与反应速率呈线性关系。有关样品制备和反应中蛋白质用量的指南, 请参见附录。

表 1: 1 mL 测定的反应方案。

示例类别	酶	1 $\times$ 检测缓冲液	稀释抑制剂解决方案	工作的缓冲液	DTNB
空的	0	70 $\mu\text{L}$	0	900 $\mu\text{L}$	30 $\mu\text{L}$
正面统治	10 $\mu\text{L}$	60 $\mu\text{L}$	0	900 $\mu\text{L}$	30 $\mu\text{L}$
未知样本	X $\mu\text{L}$	70-x $\mu\text{L}$	0	900 $\mu\text{L}$	30 $\mu\text{L}$
含抑制剂的未知样品	X $\mu\text{L}$	70-x $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$	900 $\mu\text{L}$	30 $\mu\text{L}$

注: x = 未知样品体积 (不超过 50  $\mu\text{L}$ )。并非所有检测项目都需要阳性对照。

#### 步骤:

1. 使用酶动力学程序将分光光度计设置为 412 nm, 具体操作如下: 延迟 = 120 秒; 间隔 = 10 秒; 读数次数=6。

2. 向每个 1mL 比色皿中加入 900  $\mu\text{L}$  工作缓冲液。

3. 根据表 1 中的反应方案添加其他组分:

向指定比色皿中加入未知样品的 x $\mu\text{L}$  和 1 $\times$ 检测缓冲液的 70-x $\mu\text{L}$ 。反向混合。对于阳性对照的活性, 添加 10 取 10  $\mu\text{L}$  硫氧还蛋白还原酶阳性对照液与 60  $\mu\text{L}$  1 $\times$ 测定缓冲液加入指定比色杯, 倒置混匀。20  $\mu\text{L}$  稀释后的抑制剂溶液可完全抑制 10  $\mu\text{L}$  阳性对照液中的酶活性。进行抑制反应时, 向指定比色皿中加入 x  $\mu\text{L}$  样品、50-x $\mu\text{L}$  1 $\times$ 测定缓冲液及 20 $\mu\text{L}$  稀释抑制剂溶液, 通过倒置混匀。

4. 向各比色皿中加入 30  $\mu\text{L}$  DTNB 溶液, 通过倒置混匀启动反应。

5. 通过测定各反应的吸光度增加 ( $\Delta A_{412\text{min}}$ ) 来确定黄色形成的速率。

6. 计算硫氧还蛋白还原酶 (TR) 活性含量:

$$\begin{aligned} \text{TR Activity} &= \\ \frac{\text{Unit}}{\text{ml}} &= \frac{\Delta A_{412}/\text{min}(\text{TR}) \times D \times V}{S} \\ \Delta A_{412}/\text{min}(\text{TR}) &= \Delta A_{412}/\text{min}(\text{Sample}) \\ &\quad - \Delta A_{412}/\text{min}(\text{Sample} + \text{Inhibitor}) \end{aligned}$$



注: D =样品稀释因子;

V = 反应总体积 (毫升);

S = 样品酶体积 (毫升)

单位定义: 哺乳动物硫氧还蛋白还原酶的一个单位将在 25° C、pH 7.0 时, 每毫升每分钟使 A<sub>412</sub> 增加 1.0 (在仅含 DTNB 的非偶联测定中测量)。

注: 1 毫升的检测体系可调整为适用于 96 孔板, 具体方法可参考文中所述的反应方案。表 2。

表 2: 96 孔板试验的反应方案。

样本	酶	1×检测缓冲液	已稀释抑制剂解决方案	工作的缓冲液	DTNB
空的	0	14 μL	0	180 μL	6 μL
正面统治	2 μL	12 μL	0	180 μL	6 μL
未知样本	X μL	14-xμL	0	180 μL	6 μL
含抑制剂的未知样品	X μL	10-xμL	4 μL	180 μL	6 μL

注: 本实验中酶活性的计算需根据 1 毫升比色皿 (1 厘米) 与所用培养板的路径长度差异进行调整。标准 96 孔聚苯乙烯培养板包含 200 μ 液体的光程长度约为 0.55 厘米。使用 96 孔板测得的活性 (单位/毫升) 需除以 0.55, 才能与 1 毫升比色皿测得的活性进行比较。

#### 附录:

动物组织中的硫氧还蛋白还原酶活性因器官而异。粗提物 (1,000× g 上清液) 的活性值为每克组织 1-14 个单位 (每毫克蛋白质 0.05-0.6 个单位)。在抑制剂存在时, 由于其他 NADPH 还原酶的存在, 残留活性的范围为 5%~50%。细胞培养提取物的活性范围为每 10 个 8 细胞 0.4-4 个单位 (每毫克蛋白 0.04-0.25 单位)。在存在抑制剂的情况下, 由于其他 NADPH 还原酶, 残留活性的范围为 15-40%。

#### 样品制备

##### 所需但未提供的试剂和设备

- 1.蛋白酶抑制剂鸡尾酒, 用于哺乳动物细胞和组织培养提取物。
- 2.Dulbecco 磷酸盐缓冲液 (PBS)。
- 3.CelLyticIII M, 哺乳动物细胞裂解/提取试剂。
- 4.sorvall® RC-5C 离心机, 带 SS-34 头或等同产品。
- 5.微型离心机。
- 6.研钵和玻璃管, Potter-Elvehjem (玻璃均质器中的 PTFE), 8 ml。
- 7.顶置式电动机。
- 8.Bradford 试剂。

##### 提取程序:

- 1.从动物组织或培养细胞中提取的样本, 需按 1: 100 比例向提取缓冲液中加入蛋白酶抑制剂混合液, 以避免样本发生非预期的蛋白酶解。
- 2.用 PBS 洗涤细胞系后, 置于离心管中离心。测定酶活性需约 0.5-1×10<sup>8</sup> 个细胞, 建议用 1 体积 CelLyticM (目录号 C2978) 提取细胞浓缩液, 将裂解液以 10,000× g 离心 10 分钟, 取上清液作为酶样品。
- 3.含有大量血液的动物组织在提取前需用 PBS 缓冲液清洗。随后使用含蛋白酶抑制剂混合液的 0.25× 浓度检测缓冲液, 按 4: 1 体积比加入组织样本, 通过波特-埃尔维海姆匀浆器进行匀浆处理。样本可选择两种离心方案: 1000×g 离心 5 分钟以去除粗细胞碎片, 或 10000×g 离心 15 分钟以分离线粒体等亚细胞器。无论采用哪种方案, 离心后的上清液均可作为酶标检测样本使用。
- 4.使用 Bradford 试剂测定上清液的蛋白质浓度。