谷胱甘肽还原酶（GR）检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1022

保存：-20℃避光保存 12 个月

规格：48T/96T

适用样本：血清（浆）、动植物组织、细胞、细菌

产品简介

谷胱甘肽还原酶（GR）是广泛存在于真核和原核生物中的一种黄素蛋白氧化还原酶，GR 催化 GSSG 还原生成 GSH，是谷胱甘肽氧化还原循环的关键酶之一（通常昆虫中 GR 被硫氧还蛋白还原酶（TrxR）取代）。GR 催化 NADPH 还原 GSSG 生成 GSH，有助于维持体内 GSH/GSSG 比值平衡。GR 在氧化胁迫反应中对活性氧清除起关键作用，此外，GR 还参与抗坏血酸-谷胱甘肽循环途径。本试剂盒提供了一种简单的检测方法，用于检测生物样本，如血清（浆）、动植物组织、细胞以及细菌样本中 GR 的活性水平。其原理是，GR 能催化 NADPH 还原 GSSG 再生 GSH，同时 NADPH 脱氢生成 $NADP^+$；NADPH 在 340nm 有特征吸收峰，相反 $NADP^+$在该波长无吸收峰；通过测定 340nm 吸光度下降速率来测定 NADPH 脱氢速率，从而计算 GR 活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
试剂一	60mL	120mL	4℃保存
试剂二	1mL	2mL	4℃避光保存
试剂三	1	1	-20℃避光保存

自备耗材

酶标仪或紫外分光光度计（能测 340nm 处的吸光度）及水浴锅
96 孔 UV 板或微量石英比色皿、可调节式移液枪及枪头
低温离心机
去离子水
匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。
试剂二：即用型；使用前，平衡到室温；4℃避光保存。
试剂三：粉剂；使用前 96T 每管加入 2mL 去离子水，48T 加入 1mL 去离子水，混匀，现配现用，置于冰上；分装-20℃避光保存。

样本制备

动植物组织：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 预冷的试剂一，冰浴匀浆，10,000g，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。
细胞或细菌：收集 500 万细胞或细菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，离心后弃上清，加入 1mL 预冷的试剂一，冰浴超声波破碎细胞或细菌 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），然后 10,000g，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。
血清（浆）：直接测定。

注意：

1. 推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月，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，匀浆液避免反复冻融。

2. 细胞中 GR 活性测定时，细胞数目须在 3~5×10^6之间，细胞中 GR 的提取时可加试剂一后匀浆或超声波处理，不能用细胞裂解液处理细胞。

3. 如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 法蛋白质定量试剂盒，进行样本蛋白质浓度测定。由于试剂一中含有一定浓度的蛋白（约 0.1mg/mL），所以在测定样本蛋白浓度时需要减去试剂一本身的蛋白含量。

实验步骤

1. 酶标仪或紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 340nm，紫外分光光度计去离子水调零。
2. 试剂一置于 25℃（普通物种）或者 37℃（哺乳动物）中预热 30min 以上。
3. 样本测定：在 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中依次加入 10μL 试剂二，20μL 试剂三，20μL 样本，150μL 试剂一，混匀，于 340nm 测定 10s 和 190s 吸光度，记为 A_1和 A_2，计算△A=A_1-A_2

注意：

1. 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。确保 180s 内吸光值变化呈线性（可每分钟测定 1 次观察变化趋势），当出现初始 180s 内吸光值不稳定时，可以适当延长反应时间，选取相对稳定的时间段内吸光值变化值。如果ΔA 小于 0.001 可适当加大样本量；如果吸光值变化较为剧烈且不呈线性，样本可用试剂一进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数，哺乳动物组织一般须用试剂一稀释 2~5 倍。

2. 测定反应的温度对测定结果有影响，请控制在 25℃（一般物种）或者 37℃（哺乳动物）。

3. 因通过反应速率计算酶活，使用 96 孔 UV 板时请根据操作速度控制一次测定的样本数（通常一次测定 4-8 个样本）。

结果计算

A. 使用 96 孔板测定的计算公式

（1）按蛋白浓度计算

活性单位定义：在一定温度，pH 8.0 条件下，每毫克蛋白在反应体系中每分钟催化 1nmol NADPH 氧化。

GR 酶活(U/mg prot)=[△A÷(ε×d)×$V_{反总}$×10^9]÷(Cpr×$V_{样}$)÷T=1072×△A÷Cpr

（2）按样本鲜重计算

活性单位定义：在一定温度，pH 8.0 条件下每克样品在反应体系中每分钟催化 1nmol NADPH 氧化。

GR 酶活(U/g 鲜重)= [△A÷(ε×d)×$V_{反总}$×10^9]÷($V_{样}$÷$V_{样总}$×W)÷T=1072×△A÷W

（3）按细胞数量计算

活性单位定义：在一定温度，pH 8.0 条件下，每 10^4个细胞在反应体系中每分钟催化 1nmol NADPH 氧化。

GR 酶活(U/10^4 Cells)=[△A÷(ε×d) ×$V_{反总}$×10^9]÷(500×$V_{样}$÷$V_{样总}$)÷T=2.144×△A

（4）按液体体积计算

活性单位定义：在一定温度中，pH 8.0 条件下，每毫升液体样本在反应体系中每分钟催化 1nmol NADPH 氧化。

GR 酶活(U/mL)=[△A÷(ε×d)×$V_{反总}$×10^9]÷$V_{样}$÷T=1072×△A

ε：NADPH 摩尔消光系数 6.22×10^3 L/mol/cm；d：96 孔板光径，0.5cm；$V_{反总}$：反应体系总体积，200μL=2×10^{-4}L；10^9：1mol=1×10^9nmol；Cpr：上清液蛋白浓度，mg/mL；W：样品质量，g；$V_{样}$：加入反应体系中上清液体积，20μL=2×10^{-2} mL；$V_{样总}$：提取液体积，1mL；T：反应时间，3min；500：细胞数量，500 万。

B. 使用微量玻璃比色皿测定的计算公式

将上述计算公式中的光径 d:0.5cm 调整为 d:1cm 进行计算即可。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

产品说明书

相关产品：

PMK1023 还原型谷胱甘肽（GSH）检测试剂盒（微量法）
PMK1024 氧化型谷胱甘肽（GSSG）检测试剂盒（微量法）
PMK1027 谷胱甘肽 S-转移酶（GST）检测试剂盒（微量法）
PMK1025 谷胱甘肽过氧化物酶（GPX）检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：