

Glutathion Reductases Activity Assay Kit

谷胱甘肽还原酶(GR)活性检测试剂盒 微板法

产品编号	产品名称	规格
BL875B	谷胱甘肽还原酶(GR)活性检测试剂盒 微板法	96T

产品简介:

谷胱甘肽还原酶 (GR, EC 1.6.4.2) 是在动植物中都有发现, 是一类黄素蛋白氧化还原酶, 催化氧化型谷胱甘肽(GSSG)还原成还原型谷胱甘肽 (GSH), GSH / GSSG 的比率越高, 则越能清除氧化胁迫过程中产生的活性氧, 因此 GR 酶活性高低是衡量氧化应激能力的一个重要指标。

GR 催化 GSSG 生成的 GSH 可以与 DTNB 反应, 生成黄色产物 (TNB)。该产物在 412nm 出有最大吸收。TNB 生成量和 GR 活性成线性正相关, 可通过测定 412nm 处吸光值计算出谷胱甘肽还原酶 (GR) 的活性水平。该方法在可见光下测定, 检测产物相对传统测试方法灵敏度高、测定物更稳定、可操作性更强。

产品组成:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂 A	液体 0.6 mL×1 支	4℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部, 避免试剂浪费。
试剂 B	粉末×1 支	-20℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部, 再加 0.55 mL 蒸馏水溶解备用, 现配现用。
试剂一	粉末×1 瓶	4℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部, 再加 10mL 蒸馏水溶解。
试剂二	粉末×1 支	4℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部, 再加 1.1mL 蒸馏水溶解; 溶解后-20℃保存 2 周。
试剂三	液体 1.5mL×1 瓶	4℃保存	固体出现可以 25℃水浴 5min, 使其呈液体状态。

使用方法:

建议正式实验前, 选取 2 个样本做预测定, 了解实验样品情况, 熟悉流程, 避免样本和试剂浪费。

一、样本准备:

1. 组织样本:

- 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆;
- 12000rpm 4℃离心 10min, 取上清待测;

【注】: 1. 根据实验室条件, 可先液氮研磨, 再加提取液, 进行冰浴匀浆;

2. 根据研究需求, 可按组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 10 的比例进行提取。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.
注意: 在体外研究使用, 不用于诊断或治疗用途, 本产品不是医疗装置。



2. 细菌/细胞样本:

- 先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；
- 取约 5×10^6 个细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；
- 12000rpm 4℃离心 10min，取上清液待测。

【注】：若增加样本量，可按照每 $0.5 \sim 1 \times 10^7$ 个细菌/细胞加入 1ml 提取液的比例进行提取。

3. 液体样本:

澄清液体直接测定。若浑浊，离心后取上清检测。

二、样品测定:

- 酶标仪预热 30 min，设置温度在 25℃，设定波长到 412 nm。
- 所有试剂在使用前均须在室温或 25℃水浴锅中温育 10min。
- 在 96 孔酶标板中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管
试剂一	100
提取液	60
样本	20
试剂二	10
试剂三	10
立即混匀，于412nm波长下30s时读取初始吸光度A1，10min后再测一次吸光度A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】：1 若 ΔA 小于 0.01，可延长反应时间 T（如延长到 20min 后读 A2）或增加 V1（如由 20μL 增至 50μL，则提取液相应减少），则改变后的 T 和 V1 代入公式重新计算；若所测 ΔA 值依然在零点附近徘徊，可能样本 GR 酶活性低，建议浓缩样本后再进行测定；

2 ΔA 每分钟变化宜在 0.005-0.1，若样本 GR 酶活性过高，建议样本稀释 2~5 倍后再进行测定；

3 若 A1 值大于 1.5 且 ΔA 又小于 0.01，则样本中可能含有高浓度 GSH 等还原性物质且该酶活性比较低；可先取 200μL 离心后的上清液或澄清液体样本至新离心管中，先加 5μL 试剂 A，混匀后于 25℃静置 5min；再加 5μL 试剂 B，混匀后于 25℃静置 5min。该混合液再做为样本进行测定，则所有的计算公式再统一乘以 1.05(样本的扩大倍数)。

4 本试剂盒检测时牵涉到氧化还原反应，所有氧化剂或还原剂都会干扰本试剂盒的测定，另外硫酸钠、硫酸铵和铁氰化物都会干扰本试剂盒的测定。请尽量避免。

结果计算

1. 按蛋白浓度计算

酶活定义：在 25℃ 反应条件下，每毫克蛋白每分钟还原 1nmol GSSG 生成 2nmol GSH 为 1 个酶活单位。

$$\text{GR 酶活}(\text{nmol} / \text{min} / \text{mg prot}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \div 2 \times 10^9 \times V2) \div (Cpr \times V1) \div T \times D \\ = 73.5 \times \Delta A \div Cpr \times D$$

2. 按样本质量计算

酶活定义：在 25℃ 反应条件下，每克样本每分钟还原 1nmol GSSG 生成 2nmol GSH 为 1 个酶活单位。

$$\text{GR 酶活}(\text{nmol} / \text{min} / \text{g 鲜重}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \div 2 \times 10^9 \times V2) \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ = 73.5 \times \Delta A \div W \times D$$

3. 按细胞/细菌数量计算:

酶活定义：在 25℃ 反应条件下，每 10^4 个细胞/细菌样本每分钟还原 1nmol GSSG 生成 2nmol GSH 为 1 个酶活单位。

$$\text{GR 酶活}(\text{nmol} / \text{min} / 10^4 \text{ cell}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \div 2 \times 10^9 \times V2) \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ = 0.147 \times \Delta A$$

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.
注意：在体外研究使用，不用于诊断或治疗用途，本产品不是医疗装置。



4. 按液体体积计算

酶活定义：在 25°C 反应条件下，每毫升液体每分钟还原 1nmol GSSG 生成 2nmol GSH 1 个酶活单位。

$$\text{GR 酶活}(\text{nmol} / \text{min} / \text{mL}) = (\Delta A \div \varepsilon \div d \div 2 \times 10^6 \times V_2) \div V_1 \div T \\ = 73.5 \times \Delta A$$

ε ----TNB 摩尔消光系数, $1.36 \times 10^4 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$

d ----光径, 0.5 cm

2----1 μmol GSSG 生成 2 μmol GSH

W ----样本质量, g

D ----稀释倍数, 未稀释, 即为 1

V ----提取液体积, 1 mL

V_1 ----加入反应体系中上清液体积, 20 $\mu\text{L} = 2 \times 10^{-2} \text{ mL}$

V_2 ----反应体系总体积, 200 $\mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$

C_{pr} ----上清液蛋白浓度 (mg/mL)

T ----反应时间, 10min, 若延长反应时间则代入计算公式重新计算

注意事项:

1. 样品处理等过程均需在冰上进行, 须在当日测定酶活力, 酶活粗提液避免反复冻融。
2. 试剂三不太稳定, 要严格按照后续说明操作, 谨防失活。
3. 本试剂盒检测时牵涉到氧化还原反应, 所有氧化剂或还原剂都会干扰本试剂盒的测定, 另外硫酸钠、硫酸铵和铁氰化物都会干扰本试剂盒的测定。请尽量避免。
4. 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。
5. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期:

-20°C 保存六个月。

