

液体样本谷胱甘肽还原酶检测试剂盒 E2003

描述: 液体样本谷胱甘肽还原酶检测试剂盒 (Glutathione Reductase Assay Kit) 是一种灵敏简单的利用比色法检测谷胱甘肽还原酶 (GR) 活性的试剂盒。谷胱甘肽包括还原型谷胱甘肽 (GSH) 和氧化型谷胱甘肽 (GSSG)。GSH 是细胞中巯基的主要来源, 对于维护蛋白巯基适当的氧化还原状态有重要作用。GR 广泛分布在各种组织细胞和体液中, 可以还原 GSSG 生成 GSH, 维持细胞内或体液中充足的 GSH。

原理: GR 可以将 GSSG 还原为 GSH, GSH 可以和 DTNB 反应生成黄色的 TNB 和 GSSG。在 GSSG 和 DTNB 相对过量的条件下, 利用该反应可以通过测定生成 TNB 的吸光度 (A_{412nm}) 定量检测 GR 活性。

反应如下:



本试剂盒以 GSH 以 TNB 标准品和反应时间定量 GR 酶活性。检测线性范围为 4.7-150mU/ml, 灵敏度 $\leq 4.7\text{mU/ml}$ 。

适用范围: 本试剂盒能够检测动物血浆、裂解液上清等多种其它生物样本中的 GR 活性。

所需设备: 酶标仪, 最佳工作波长 412nm

组成:

组份名称	规格	数量
谷胱甘肽还原酶检测缓冲液	50ml/瓶	1
样品稀释液	50ml/瓶	1
DTNB	4mg/管	1
TNB 溶液 (300 μM)	1 ml/管	1
氧化型谷胱甘肽 (GSSG)	12 mg/管	1
谷胱甘肽还原酶 (GR)	50 μl /管	1
NADPH	5 mg/管	1
DMSO	1.2 ml/管	1

储存条件: -20 $^{\circ}\text{C}$ 储存, 一年有效。NADPH 配制成溶液后, 可适当分装, -70 $^{\circ}\text{C}$ 储存。GSSG 和 DTNB 溶解后, -20 $^{\circ}\text{C}$ 储存。

操作步骤:

1. 样品的准备

血浆样品或红细胞裂解液的准备: 取新鲜抗凝血至少 0.5ml, 4 $^{\circ}\text{C}$, 1000g 离心 5 分钟, 上清为血浆。对于沉淀中红细胞, 利用冰冷 PBS 洗涤 3 次。取约 5 倍红细胞体积的冰冷的纯水, 重悬细胞沉淀, 冰浴 10 分钟。4 $^{\circ}\text{C}$, 10000g 离心 10 分钟。取上清进行蛋白浓度定量后用于谷胱甘肽还原酶的测定。不立即测定的样品可以 -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存。如果样品中谷胱甘肽还原酶活性超出测定范围, 可利用样品稀释液适当稀释后测定, 稀释倍数请通过预实验确定。

2. 试剂盒的准备

2.1 GSSG 储备液的配制: 在本试剂盒提供的 12mg GSSG 中加入 1ml 的纯水, 溶解并混匀, 即为 GSSG 储备液, 浓度为 10mM。

2.2 DTNB 储备液的配制: 在本试剂盒提供的 4mg DTNB 中加入 1ml 本试剂盒提供的 DMSO 溶解并混匀,

即为 DTNB 储备液，浓度为 10mM。

2.3 NADPH 储备液的配制：在本试剂盒提供的 5mg NADPH 中加入 1ml 纯水，溶解并混匀，即为 NADPH 储备液，浓度为 5mg/ml。

2.4 谷胱甘肽还原酶检测工作液的配制：根据待测样品数参考下表配制适当量的总谷胱甘肽检测工作液，表中试剂按比例混合后即为谷胱甘肽还原酶检测工作液。

	1 个样品	10 个样品	50 个样品
谷胱甘肽还原酶检测缓冲液	125 μ l	1.25ml	6.25ml
GSSG 储备液	10 μ l	100 μ l	500 μ l
DTNB 储备液	5 μ l	50 μ l	250 μ l

2.5 NADPH 工作液的配制：取 NADPH 储备液，利用谷胱甘肽还原酶检测缓冲液稀释 10 倍，配制为 0.5mg/ml 的 NADPH 工作液。每检测一个样品需要 50 μ l 的 0.5mg/ml NADPH。

3. 标准品的准备

将 300 μ M 的 TNB 溶液用谷胱甘肽还原酶检测缓冲液稀释成 150、75、37.5、18.8、9.4 μ M 浓度的 TNB 溶液，用于标准曲线测定。在本试剂盒相同反应体系下 TNB 标准曲线只需要测定 1 次，后续测定只需利用该标曲进行酶反应产物 TNB 生成量的计算。

4. 测定方法

4.1 TNB 标准曲线测定：利用上述系列浓度 TNB 标准品，各取 200 μ l 到 96 孔板中，TNB 各孔加入量分别为 60、30、15、7.5、3.75、1.88、0nmol，测定 A_{412nm}。

4.2 参考下表，使用 96 孔板，依次加入谷胱甘肽还原酶检测工作液、样品后，混匀，25 $^{\circ}$ C 或室温孵育 2 分钟。

	空白对照	阳性对照	样品
谷胱甘肽还原酶检测工作液	140 μ l	140 μ l	140 μ l
谷胱甘肽还原酶	—	1 μ l	—
样品	—	—	10 μ l
样品稀释液	11 μ l	10 μ l	1 μ l
25 $^{\circ}$ C 孵育	2 min	2 min	2 min
NADPH 工作液	50 μ l	50 μ l	50 μ l
25 $^{\circ}$ C 孵育	20 min	20 min	20 min

4.3 各孔加入 NADPH 工作液 50 μ l，25 $^{\circ}$ C 孵育 20 分钟。

4.4 孔加入 NADPH 工作液 50 μ l 启动谷胱甘肽还原酶反应后，立即开始计时，并在 2.5、5、10、20 分钟等时间点测定 A_{412nm}。如果样品吸光度升高过快，可适度稀释样品后测定；如果样品吸光度升高过慢，可适当延长反应时间进行样品测定。

5. 数据处理

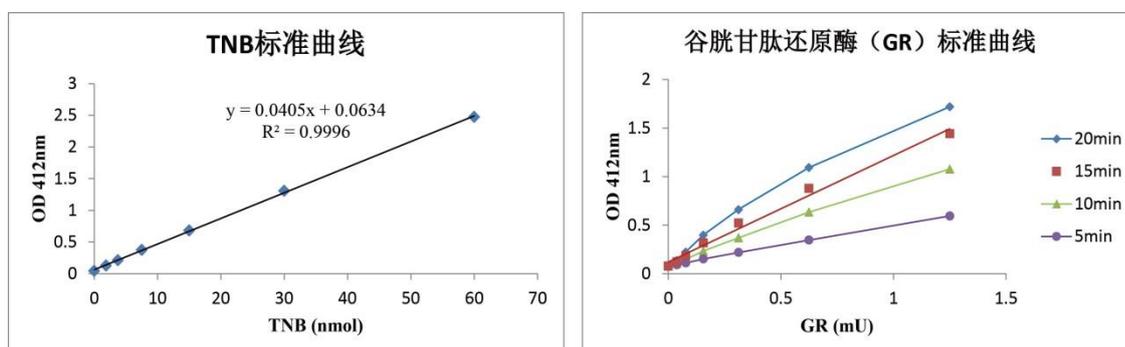
利用 TNB 标准品的量为横坐标，吸光度值为纵坐标制作标准曲线，并获得横纵坐标之间的函数关系式，然后利用该标准曲线和各样品的吸光度值计算样品中一定时间段(注：计算酶活性时间段最好采用 5-15 分钟时间段，这样可以避免样品本身的颜色及样品中较高浓度 GSH 和 NADPH 对反应的干扰)内产生的 TNB 量，从而换算为谷胱甘肽还原酶活力（注意精确计时）。由于有多个时间点的测定，可以选择时间线性良好的时间段计算谷胱甘肽还原酶活力。

谷胱甘肽还原酶定义：在 25 $^{\circ}$ C，pH 7.6 条件下，每分钟还原 1.0 μ mol GSSG 为 GSH 的谷胱甘肽还原酶为 1

U, 1 U=1000 mU。

计算公式: 酶活力(mU)=TNB 生成量 (nmol) /2/反应时间(min)。

TNB 标准曲线及阳性对照谷胱甘肽还原酶测定如下图所示:



参考文献

1. Foyer, C.H., Lelandais, M., and Kunert, K.J., 1994. Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.* 92, 696-717.
2. Baillie, T.A. and Slatter, J.G., 1991. Glutathione: A vehicle for the transport of chemically reactive metabolites in vivo. *Acc. Chem. Res.* 24, 264-270.

注意事项

1. 本试剂盒检测涉及氧化还原反应, 很多氧化剂和还原剂都会干扰试剂盒的测定, 特别是巯基乙醇、DTT 等含有巯基的试剂会严重干扰本试剂盒的测定; 另外硫酸钠、硫酸铵和铁氰化物也会干扰本试剂盒的测定, 请尽量避免。
2. 严格控制反应的温度和反应时间, 样品中酶活性过低时, 可适当延长反应时间。
3. TNB 标准曲线只需测定 1 次即可, 主要用于酶标板测定体系下校正吸光系数, 传统文献报道的 TNB 吸光系数适用于分光光度计测定。
4. NADPH 在溶液中容易分解, 要严格按储存条件保存。
5. 初次使用试剂盒时, 粉末试剂和小体积液体试剂请适当离心后使用。
6. 本产品仅限专业人员用于科学研究, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品。
7. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。