

组织细胞谷胱甘肽还原酶检测试剂盒

E2013

描述: 组织细胞谷胱甘肽还原酶检测试剂盒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: 本试剂盒能够检测培养细胞、实体动物组织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
组织细胞裂解液	100ml/瓶	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

1.1 细胞样品的准备: 收集新鲜细胞, PBS 洗涤细胞一次, 离心收集细胞, 吸尽上清。加入 200 μl 的 Western 及 IP 细胞裂解液裂解细胞, 冰浴 30 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活性的测定。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, 可利用谷胱甘肽还原酶检测缓冲液适当稀释后测定, 稀释倍数请通过预实验确定。

1.2 组织样品的准备: 利用含 1mMEDTA 的 PBS 灌注或漂洗组织, 去除组织中的血液, 然后取组织样品约 20 mg。加入 Western 及 IP 细胞裂解液 400 μl , 冰浴匀浆。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活性的测定。不立即测定的样品可以-70℃保存。如果样品中谷胱甘肽还原酶活性超出测定范围,可利用谷胱甘肽还原酶检测缓冲液适当稀释后测定,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℃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℃孵育	2 min	2 min	2 min
NADPH 工作液	50 μ l	50 μ l	50 μ l
25℃孵育	20 min	20 min	20 min

4.3 各孔加入 NADPH 工作液 50 μ l, 25℃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。

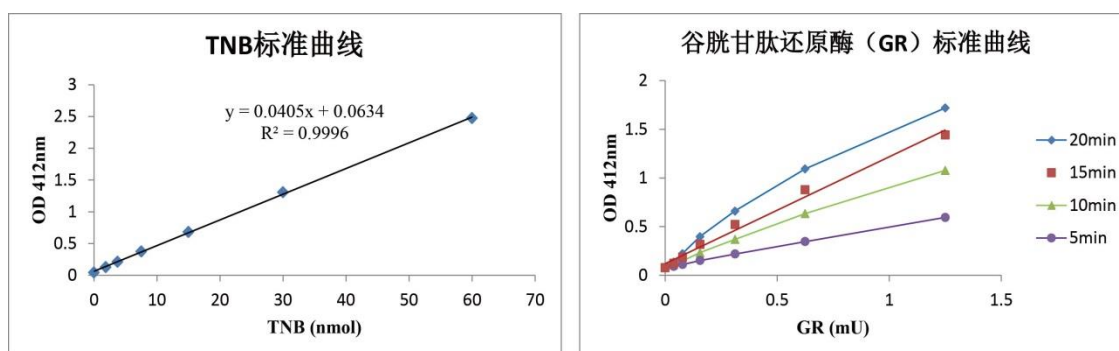
5. 数据处理

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。对于细胞和组织样品, 可以根据样品中蛋白浓度测定, 计算每毫克蛋白中谷胱甘肽还原酶活力。

谷胱甘肽还原酶定义: 在 25℃, 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。