谷胱甘肽还原酶（GR）检测试剂盒（分光法）

货　　号：PMK1022BKS
规　　格：25 管/24S 50 管/48S
检测方法：比色法
储存条件：-20℃避光保存 12 个月

建议正式实验前，选取 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验，如果样本吸光值不在检测范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

一、产品简介

研究背景：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。

检测原理：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。

检测意义：评估机体抗氧化能力、评估维生素 B_2 营养状态、监测肝损伤等相关疾病的进程。

适用样本：血清（浆）、动植物组织、细胞、细菌

二、产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	25 管	50 管	
试剂一	80mL	80mL×2 瓶	4℃保存
试剂二	5mL	10mL	4℃避光保存
试剂三	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃避光保存

三、需自备的仪器和用品

紫外分光光度计（能测 340nm 处的吸光度）、石英比色皿、可调节式移液枪及枪头、恒温箱、制冰机、低温离心机、去离子水、匀浆器（如果是组织样本）

四、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；使用前每管加入 5mL 去离子水，混匀，现配现用，置于冰上；分装-20℃避光保存。

五、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。可根据预实验确定的稀释倍数用试剂一进行稀释。

⚠ **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。

六、实验步骤

1.紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 340nm，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：在石英比色皿中依次加入 100μL 试剂二，200μL 试剂三，200μL 样本，1500μL 试剂一，混匀，于 340nm 测定 10s 和 190s 吸光度，记为 A_1 和 A_2，计算$\triangle A=A_1-A_2$

该反应体系是按照常规的容量 3mL 左右的比色皿设计的，如果比色皿最适合的加样体积不是 2mL 左右，可以根据实际需要的体积按比例调整。

⚠ **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 内吸光值变化基本呈线性（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，或减少提取用样本量。

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）。

七、结果计算

1.按蛋白浓度计算

活性单位定义：在一定条件下，每毫克蛋白在反应体系中每分钟催化 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

GR 酶活(U/mg prot)=[$\triangle A\div(\varepsilon\times d)\times V_{反总}\times10^9$]÷(Cpr×$V_{样}$)÷T=536×$\triangle A$÷Cpr

2.按样本鲜重计算

活性单位定义：在条件下每克样品在反应体系中每分钟催化 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

GR 酶活(U/g 鲜重)= [$\triangle A\div(\varepsilon\times d)\times V_{反总}\times10^9$]÷($V_{样}\div V_{样总}\times W$)÷T=536×$\triangle A$÷W

3.按细胞数量计算

活性单位定义：在一定条件下，每 10^4 个细胞在反应体系中每分钟催化 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

GR 酶活(U/104 Cells)=[$\triangle A\div(\varepsilon\times d)\times V_{反总}\times10^9$]÷(500×$V_{样}\div V_{样总}$)÷T=1.072×$\triangle A$

4.按液体体积计算

活性单位定义：在一定条件下，每毫升液体样本在反应体系中每分钟催化 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

GR 酶活(U/mL)=[$\triangle A\div(\varepsilon\times d)\times V_{反总}\times10^9$]÷$V_{样}$÷T=536×$\triangle A$

ε：NADPH 摩尔消光系数 6.22×10^3 L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；$V_{反总}$：反应体系总体积，2mL=2×10^{-3} 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，200μL=0.2mL；$V_{样总}$：提取液体积，1mL；T：反应时间，3min；500：细胞数量，500 万。

附录：常见问题与解决方案（FAQ）

问题	解决措施
计算时如果选择合适的计算公式？	动物组织及细胞微生物等，可以用质量或者细胞数量计算，也可以建议测蛋白浓度
	植物可建议用质量计算，也可以建议测蛋白
	血液或是其他液态样品，可建议用体积计算
	如客户要购买蛋白含量测定试剂盒，除了说明书强调用考马斯亮蓝法的，通常建议 BCA 法。动植物组织因为蛋白含量高，在 10mg/ml 左右，如果用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度的话通常需要用 PBS 缓冲液等稀释液进行稀释。
测定时如何进行调零？	除说明书中提示用对照管或某种试剂调零外，都用纯水调零。
试剂盒中样本提取时需要 0.1g 组织，我的样品量不够怎么办？	通常可以按比例缩小，如说明书中是约 0.1g 组织加 1ml 提取液，可以等比例缩小，如 0.05g 组织加 0.5ml 提取液提取。后续操作不变。
	对于数量少的样品，一方面可以减少提取液体积，另一方面还可以延长反应时间。

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。

相关产品：

PMK1023BKS 还原型谷胱甘肽（GSH）检测试剂盒（分光法）

PMK1024BKS 氧化型谷胱甘肽（GSSG）检测试剂盒（分光法）

PMK1025BKS 谷胱甘肽过氧化物酶（GPX）检测试剂盒（分光法）

更多产品详情了解，请关注公众号：