# 谷胱甘肽还原酶（GR）检测试剂盒（DTNB 法/微量法）

货　　号：PMK1966BKM
规　　格：48T/24S 96T/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易用的比色法，用于分析各种生物样品中 GR 的活性。其原理是 GR 能催化 NADPH 还原 GSSG 再生 GSH，同时 NADPH 脱氢生成 NADP+；每氧化 1 mol NADPH 可生成 2 mol GSH。GSH 和 5,5’ -二硫代-双-（2-硝基苯甲酸）反应生成黄色的 2-硝基-5-巯基苯甲酸，产物在 412 nm 处有特征吸收峰，通过吸光值上升速率即可表征谷胱甘肽还原酶活性。

**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 |
|---|---|---|---|
| | 48T | 96T | |
| 试剂一 | 60mL | 120mL | 4℃保存 |
| 试剂二 | 1mL | 2mL | 4℃保存 |
| 试剂三 | 粉剂×1 支 | 粉剂×2 支 | -20℃避光保存 |
| 试剂四 | 10mL | 20mL | 4℃保存 |
| 试剂五 | 粉剂×1 瓶 | 粉剂×2 瓶 | 4℃避光保存 |
| 标准品 | 粉剂×1 支 | 粉剂×2 支 | 4℃避光保存 |

## 三、需自备的仪器和用品

酶标仪或可见光分光光度计（能测 412nm 处的吸光度）及水浴锅、96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头、离心机、制冰机、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℃保存。

试剂三：使用前每管加入 1mL 去离子水，混匀，现配现用，置于冰上；分装-20℃避光保存。

试剂四：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂五：临用前每瓶加入 2.5mL 去离子水溶解；4℃避光保存。

50mM GSH 标准品：每管 GSH 标准品含 15.4mg GSH，使用时加 1mL 去离子水得 50mM GSH 标准品，用不完的试剂分装-20℃保存。

2000μM GSH 标准品：取 40μL 50mM GSH 标准品用 960μL 去离子水稀释。

标准曲线设置： 使用 2000μM GSH 标准品，按照下表所示，进一步稀释标准品：

| | 标准品体积（μL） | 去离子水体积（μL） | 标准品浓度(μM) |
|---|---|---|---|
| Std.1 | 200μL 2000μM | 0 | 2000 |
| Std.2 | 100μL of Std.1（2000μM） | 100 | 1000 |
| Std.3 | 100μL of Std.2 （1000μM） | 100 | 500 |
| Std.4 | 100μL of Std.3（500μM） | 100 | 250 |
| Std.5 | 100μL of Std.4（250μM） | 100 | 125 |
| Std.6 | 100μL of Std.5（125μM） | 100 | 62.5 |
| Std.7 | 100μL of Std.6（62.5μM） | 100 | 31.25 |

⚠ **注意：每次实验，请使用新配制的标准品。**

## 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. 酶标仪或可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 412nm，可见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 EP 管中依次加入下列试剂

| | 标准（μL） | 空白（μL） | 测定（μL） | 对照（μL） |
|---|---|---|---|---|
| 试剂二 | 0 | 0 | 10 | 0 |
| 试剂三 | 0 | 0 | 20 | 0 |
| 标准品 | 20 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 去离子水 | 0 | 20 | 0 | 0 |
| 样本 | 0 | 0 | 20 | 20 |
| 试剂一 | 180 | 180 | 150 | 180 |
| 迅速混匀，放入 37℃准确孵育 5min | | | | |

取反应液 100uL 加入 96 孔板或微量玻璃比色皿中：

| | 标准（μL） | 空白（μL） | 测定（μL） | 对照（μL） |
|---|---|---|---|---|
| 反应液 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 试剂四 | 80 | 80 | 80 | 80 |
| 试剂五 | 20 | 20 | 20 | 20 |

充分混匀，37℃避光孵育 10min,记录 10min 时 412nm 处的吸光度 A，计算$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{对照}$，$\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}$。每个测定管需设一个对照，空白和标准曲线只需要测一次。

⚠ **注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果$\Delta A_{测定}$小于 0.001 可适当加大样本量。如果$\Delta A_{测定}$大于 0.8，样本可用试剂一进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数。**

## 七、结果计算

1. 标准曲线的绘制：

以标准品浓度为 y 轴，$\Delta A_{标准}$为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。将$\Delta A_{测定}$带入方程计算出 y 值（1μM=1nmol/mL）。

2. 样本 GR 活性计算

（1）按样本质量计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟产生 2nmolGSH 定义为一个酶活性单位 U。

GR 活性(U/g 质量) = $(y\div2\times V_{反总})\div(W\times V_{样}\div V_{样总})\div T\times n=y\div W\times n$

（2）按液体样本体积计算

单位的定义：每 mL 液体样本在反应体系中每分钟产生 2nmolGSH 定义为一个酶活性单位 U。

GR 活性(U/mL) = $(y\div2\times V_{反总})\div V_{样}\div T\times n=y\times n$

（3）按细菌或细胞数量计算

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟产生 2nmolGSH 定义为一个酶活力单位 U。

GR 活性(U/$10^4$ cell)= $(y\div2\times V_{反总})\div(500\times V_{样}\div V_{样总})\div T\times n=0.002\times y\times n$

（4）按蛋白浓度计算

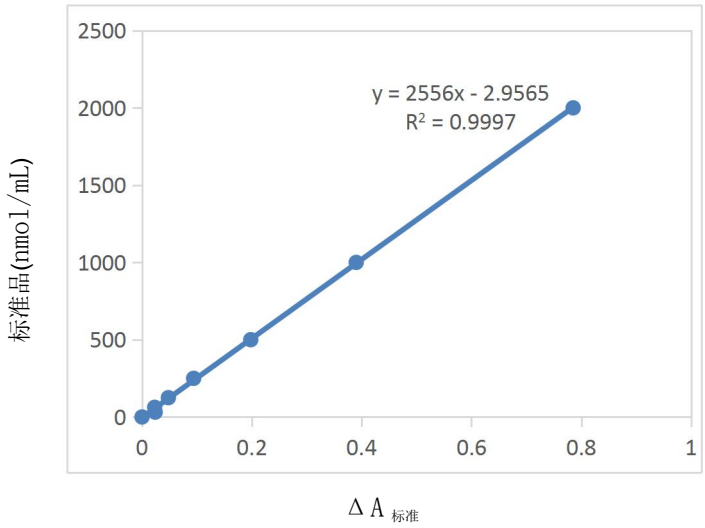
单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟产生 2nmolGSH 定义为一个酶活力单位 U。

GR 活性（U/mg prot）=$(y\div2\times V_{反总})\div(Cpr\times V_{样})\div T\times n=y\div Cpr\times n$

$V_{反总}$：反应体系总体积，0.2mL；W：样本质量，g；$V_{样}$：加入样本体积，0.02mL；$V_{样总}$：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，5min；n：样本稀释倍数；500：细胞或细菌总数，500 万；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL。

## 结果展示

典型标准曲线




**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：**

PMK1023BKM 还原型谷胱甘肽（GSH）检测试剂盒（微量法）

PMK1024BKM 氧化型谷胱甘肽（GSSG）检测试剂盒（微量法）

PMK1022BKM 谷胱甘肽还原酶（GR）检测试剂盒（微量法）

PMK1025BKM 谷胱甘肽过氧化物酶（GPX）检测试剂盒（微量法）

PMK1962BKM 谷胱甘肽过氧化物酶（GPX）检测试剂盒（DTNB 法/微量法）

***更多产品详情了解，请关注公众号：***