



## 谷胱甘肽还原酶检测试剂盒(DTNB 法)

## Glutathione Reductase Assay Kit with DTNB

## 包装清单

Cat No.	组分	包装规格-100T
MCK-0050	谷胱甘肽还原酶检测缓冲液	50mL
	样品稀释液	50mL
	NADPH	5mg
	氧化型谷胱甘肽(GSSG)	14.2mg
	DTNB	4.5mg
	DMSO	1.5mL
	说明书	1 份

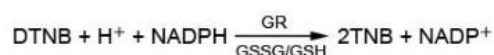
## 产品简介

谷胱甘肽还原酶检测试剂盒(DTNB 法)(Glutathione Reductase Assay Kit with DTNB)是一种简单易行的通过比色法来检测细胞、组织或其它样品中谷胱甘肽还原酶(Glutathione reductase, GR)活性的试剂盒。谷胱甘肽还原酶在许多组织中都有分布, 可以维持细胞内充足的还原型谷胱甘肽(GSH)水平。GSH 可以清除自由基和一些有机过氧化物, 或作为谷胱甘肽氧化酶(Glutathione peroxidase)的底物来清除一些过氧化物。

谷胱甘肽还原酶可以还原氧化型谷胱甘肽(GSSG)生成还原型谷胱甘肽(GSH), 而 GSH 可以和生色底物 DTNB 反应产生黄色的 TNB 和 GSSG, 并可以通过测定  $A_{412}$  来检测 TNB 的生成量。适当设置反应体系, 前后两个反应合并起来后, GSSG/GSH 过量而 GR 相对不足时, 该反应体系中谷胱甘肽还原酶就成为整个反应体系的限速因素, 此时黄色的 TNB 生成量和谷胱甘肽还原酶的活性呈线性正相关。从而通过测定  $A_{412}$  就可以计算出谷胱甘肽还原酶的活性水平。本试剂盒的具体反应原理如下:



两个反应相合并:



## 保存条件

-20℃ 保存, 有效期一年。

NADPH 溶解后宜分装并-70℃ 保存, 4℃ 可以保存一天, -20℃ 保存一周后 NADPH 会降解 10% 以上。

GSSG 和 DTNB 在配制成溶液后, 适当分装后-20℃ 保存。。

## 注意事项

1. 本试剂盒检测时涉及氧化还原反应, 因此所有氧化剂或还原剂都会干扰本试剂盒的测定。如果在样品中的还原剂无法避免, 例如 DTT、巯基乙醇等, 则这些还原剂的总浓度至少低于 0.1mM。0.15mM 的 DTT 可以抑制 40% 的酶活力。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。
2. 样品可以立即测定, 也可以-70℃ 冻存待以后测定。
3. 一定要严格控制反应时的温度为 25℃, 否则会引起较多误差。
4. NADPH 不太稳定, 要严格按照后续说明操作, 谨防失活。
5. 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, 不得存放于普通住宅内。
6. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 使用说明

## 样品的准备:

## 1. 细胞样品的准备。

对于贴壁细胞, 由于后续用于酶活性的测定, 应避免使用胰酶消化细胞, 可以用 PBS、HBSS 或生理盐水洗涤一遍。



对于悬浮细胞，可以离心收集细胞，并用 PBS、HBSS 或生理盐水洗涤一遍。后续可以用默科生产的 Western 及 IP 细胞裂解液参考相应的说明裂解细胞样品。按照每 100 万细胞直接加入 100-200 微升裂解液的比例进行裂解。

对于贴壁细胞，可以使用细胞铲或细胞刮辅助收集细胞样品。如果出现裂解效果不佳的情况，可以把处在裂解液中的细胞样品用玻璃匀浆器在 4℃ 或冰浴匀浆。随后 4℃，12,000×g 离心 10 分钟。取上清用于酶活性的测定。

**2. 组织样品的准备。**动物用含有 0.16mg/ml heparin 的生理盐水(0.9% NaCl containing 0.16mg/ml heparin)灌流清除血液后获取组织样品。按照约每 20mg 组织加入 200 微升 Western 及 IP 细胞裂解液或其它适当的匀浆液的比例，用手持式组织研磨仪或玻璃匀浆器在 4℃ 或冰浴匀浆。4℃，12,000×g 离心 10 分钟。取上清用于酶活性的测定。

**3. 红细胞裂解液的准备。**用抗凝管收集血液，颠倒混匀。取至少 500 微升全血 4℃ 2500×g 离心 5 分钟。弃上清，用冰冷的约红细胞沉淀 10 倍体积的 Western 及 IP 细胞裂解液或其它适当的匀浆液重悬沉淀，再同前离心，弃上清。加入约红细胞沉淀 4 倍体积的冰冷的 Milli-Q 级纯水裂解红细胞。12,000×g 离心 5 分钟，取上清。

4. 上述各种样品可以用默科的 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。通常可以先取含 1-100 微克蛋白的样品用于谷胱甘肽还原酶的检测。

**注：**对于 GR 活力较高的组织样品，含 1-10 微克蛋白的样品可能就能满足检测需求，而对于 GR 活力较低的样品，可能需要 10-100 微克的蛋白量。如果发现样品中谷胱甘肽还原酶的活力过高，可以用样品稀释液进行稀释。如果样品中谷胱甘肽还原酶的活力过低，则需适当加大蛋白用量。准备好的样品如果当日测定，可以在冰浴或 4℃ 临时保存；如果不能当日检测，可以 -70℃ 冻存。

#### 试剂盒的准备工作：

1. 配制 6mM NADPH 溶液的配制。在本试剂盒提供的 5mg NADPH 中加入 1ml Milli-Q 级纯水或重蒸水，溶解并混匀，即为 6mM NADPH 溶液。除立即待用部分外，其余的 NADPH 溶液需适当分装后尽快 -70℃ 保存。

2. GSSG 溶液的配制。在本试剂盒提供的 14.2mg GSSG 中加入 10ml Milli-Q 级纯水，溶解并混匀。除立即待用部分外，其余的 GSSG 溶液需适当分装后 -20℃ 保存。

3. DTNB 溶液的配制。在本试剂盒提供的 4.5mg DTNB 中加入 1.5 毫升本试剂盒提供的 DMSO，溶解并混匀。除立即待用部分外，其余的 DTNB 溶液需适当分装后 -20℃ 保存。

4. 所有试剂在使用前均须在水浴中或 PCR 仪等设备上温育到 25℃。

#### 样品测定：

1. 参考下表(表 1)，使用 96 孔板，依次加入各溶液，混匀。

	空白对照 (blank)	样品(sample)
GSSG 溶液	100 μl	100 μl
谷胱甘肽还原酶检测缓冲液	90 μl	70-90 μl
样品	0 μl	0-20 μl
NADPH 溶液(6mM)	10 μl	10 μl
总体积	200 μl	200 μl

2. 加入 6.6 微升 DTNB 溶液，混匀。

3. 立即使用适当的酶标仪或微量紫外分光光度计测定  $A_{412}$ ，此时记录为 0 分钟读值，即  $A_{412}(\text{Time } 0)$ 。如果仪器可以设置温度，把温度设置在 25℃，否则可以通过空调调节室温到 25℃，待预计仪器也达到 25℃ 后再开始测定  $A_{412}$ 。

4. 每隔 2 分钟记录  $A_{412}$  值，即  $A_{412}(\text{Time } n)$ ，至少连续记录 10 分钟，获得 5 个点的数据。或者如果仪器具备相应功能，可以让仪器连续测定 10 分钟或自动每隔 2 分钟测定一次  $A_{412}$ 。如果样品的吸光度比较低，可以延长孵育时间，样品的吸光度在一定范围内会随时间的延长接近于线性增加的，此时可以考虑每 10 分钟测定一次吸光度。

#### 样品中谷胱甘肽还原酶活力的计算：

1. 谷胱甘肽还原酶活力单位的定义：1 个酶活力单位(1 unit)在 25℃，pH7.5 的条件下，在 1 分钟内可以还原 1 微摩尔 GSSG。

$$1 \text{ U} = 1000 \text{ mU}.$$

2. 计算时每个样品的  $A_{412}/\text{min}$  都需要扣除相应的样品本底对照测定出来的  $A_{412}/\text{min}$ 。测定出来的  $\Delta A_{412}/\text{min}$  最好能控制在 0.005-0.1 范围内。如测定出来的  $\Delta A_{412}/\text{min}$  数值过大，则可以把样品适当稀释或者减小样品的用量，如  $\Delta A_{412}/\text{min}$  数值过小，处理样品时需设法尽量浓缩样品、并适当加大样品的用量。

$$\text{注：} \Delta A_{412}(\text{blank}) = A_{412}(\text{blank, Time } n) - A_{412}(\text{blank, Time } 0);$$

$$\Delta A_{412}(\text{sample}) = A_{412}(\text{sample, Time } n) - A_{412}(\text{sample, Time } 0);$$

$$\Delta A_{412} = \Delta A_{412}(\text{sample}) - \Delta A_{412}(\text{blank});$$

$$\Delta A_{412}/\text{min} = \Delta A_{412}/n$$

3. 对于谷胱甘肽还原酶：1mU/ml = 1nmol TNB/min/ml =  $(\Delta A_{412}/\text{min})/(\epsilon \mu\text{M} \times L(\text{cm}))$

$$\text{即相当于：} [\text{检测体系中谷胱甘肽还原酶活力}] = (\Delta A_{412}/\text{min})/(\epsilon \mu\text{M} \times L(\text{cm})) = [(\Delta A_{412}(\text{sample}) - \Delta A_{412}(\text{blank}))/\text{min}]/(\epsilon \mu\text{M} \times L(\text{cm}))$$

$$[\text{样品中谷胱甘肽还原酶活力}] = [\text{检测体系中消耗谷胱甘肽还原酶活力}] \times [\text{稀释倍数}]/[\text{样品中的蛋白浓度}] =$$

$$[(\Delta A_{412}/\text{min})/(\epsilon \mu\text{M} \times L(\text{cm}))] \times [\text{dil} \times (V(\text{ml})/V_{\text{sample}}(\text{ml}))]/[\text{样品中的蛋白浓度}]$$

**注：**[检测体系中谷胱甘肽还原酶活力]的单位为 mU/ml，[样品中的蛋白浓度]的单位为 mg/ml，所以最终[样品中谷胱甘肽还原酶活力]的单位为：U/mg 蛋白或 mU/mg 蛋白； $\epsilon \mu\text{M}$  为摩尔消光系数：TNB 在  $A_{412}$  的摩尔消光系数为 0.01415  $\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ；L(cm)为测吸光度时的路径长度：200  $\mu\text{l}$  样品在一般的 96 孔中的高度约为 0.552cm，如果使用不同的反应孔，请注意修改为溶液在该孔中的高度；dil 为样品的稀



默科南京

Hot line: 025-69867707

释倍数: V(ml)为反应体系, 本反应体系为 0.2ml; V<sub>sample</sub>(ml)为反应体系中样品的体积, 以毫升表示。

4. 计算示例: 样品的蛋白浓度经测定为 5mg/ml, 用样品稀释液稀释 10 倍后, 取 10 微升稀释后的样品参考表 1 进行测定。

如果  $\Delta A_{412}/\text{min}(\text{sample})=0.048$ ,  $\Delta A_{412}/\text{min}(\text{blank})=0.006$ , 那么:

[检测体系中谷胱甘肽还原酶活力]=  $(0.048-0.006)/(0.01415 \times 0.552) = 5.38 \text{mU/ml}$

[样品中谷胱甘肽还原酶活力]=  $5.38 \text{mU/ml} \times 10 \times 0.2 / 0.01 / (5 \text{mg/ml}) = 0.2152 \text{U/mg(蛋白)}$