

谷胱甘肽还原酶检测试剂盒 (DTNB 法)

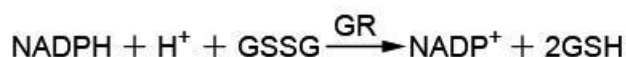
货号: RK05822

规格: 100 次

◆ 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, 或作为谷胱甘肽酶 (Glutathione peroxidase) 的底物来清除一些过氧化。

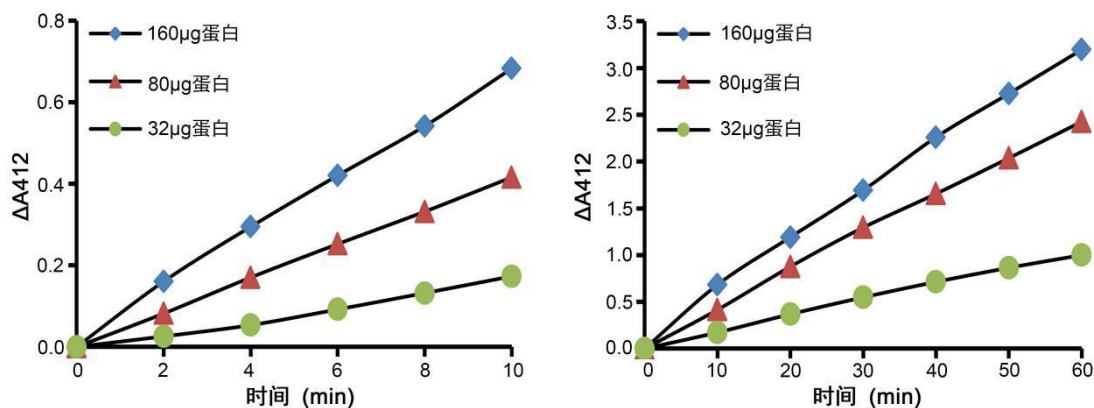
谷胱甘肽还原酶可以还原氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 生成还原型谷胱甘肽 (GSH), 而 GSH 可以和生色底物 DTNB 反应产生黄色的 TNB 和 GSSG, 并可以通过测定 A_{412} 来检测 TNB 的生成量。适当设置体系, 前后两个反应合并起来后, GSSG/GSH 过量而 GR 相对不足时, 该反应体系中谷胱甘肽还原酶就成为整个反应体系的限速因素, 此时黄色的 TNB 生成量和谷胱甘肽还原酶的活性呈线性正相关。从而通过测定 A_{412} 就可以计算出谷胱甘肽还原酶的活性水平。本试剂盒的具体反应原理如下:



两个反应相合并:



本试剂盒检测肝脏样品的检测效果如图 1 所示。图中可见, 对于肝脏样品可以检测到比较强的谷胱甘肽还原酶的活性并且有很好的剂量效应。



本试剂盒可以检测组织匀浆液上清、细胞裂解液上清等生物样品中的谷胱甘肽还原酶的

活性。一个试剂盒共可以进行 100 次检测。

◆ 试剂盒包装清单

产品编号	产品名称	规格
RM02901	谷胱甘肽还原酶检测缓冲液	50mL
RM02902	样品稀释液	50mL
RM02892	NADPH	5mg
RM02889	氧化型谷胱甘肽(GSSG)	14.2mg
RM02890	DTNB	4.5mg
RM02893	DMSO	1.5mL
—	说明书	1 份

◆ 保存条件

-20°C 保存，一年有效。NADPH 溶解后宜分装并-70°C 保存，4°C 可以保存一天，-20°C 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°C 保存。

◆ 使用方法

1. 样品的准备:

a. 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。后续用 Western 或者 IP 细胞裂解液对细胞样品进行裂解。按照每 100 万细胞直接加入 100-200 μ L 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°C 或冰浴匀浆。随后 4°C，12,000g 离心 10min。取上清用于酶活性的测定。

b. 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 μ L Western 或 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°C 或冰浴匀浆。4°C，12,000g 离心 10min。取上清用于酶活性的测定。

c. 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 μ L 全血 4°C，2500g 离心 5min。弃上清，用冰冷的约红细胞沉淀 10 倍体积的 Western 或 IP 细胞裂解液或其它适当的匀浆液重悬沉淀，再 4°C，2500g 离心 5min，弃上清。加入约红细胞沉淀 4 倍体积的冰冷的 M 超纯水裂

解红细胞。12,000g 离心 5min, 取上清。

d. 上述各种样品可以用 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 μg 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 μg 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 μg 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°C 临时保存; 如果不能当日检测, 可以 -70°C 冻存。

2. 试剂盒的准备工作:

a. 6mM NADPH 溶液的配制。

在本试剂盒提供的 5mg NADPH 中加入 1mL 超纯水, 溶解并混匀, 即为 6mM NADPH 溶液。

除立即使用部分外, 其余的 NADPH 溶液需适当分装后尽快 -70°C 保存。

b. GSSG 溶液的配制。

在本试剂盒提供的 14.2mg GSSG 中加入 10mL 超纯水, 溶解并混匀。除立即使用部分外, 其余的 GSSG 溶液需适当分装后 -20°C 保存。

c. DTNB 溶液的配制。

在本试剂盒提供的 4.5mg DTNB 中加入 1.5mL 本试剂盒提供的 DMSO, 溶解并混匀。除立即使用部分外, 其余的 DTNB 溶液需适当分装后 -20°C 保存。

d. 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°C。

3. 样品测定:

a. 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

b. 加入 6.6 μL DTNB 溶液, 混匀。

c. 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 0min 读值, 即 A_{412} (Time 0)。如果仪器可以设置温度, 把温度设置在 25°C, 否则可以通过空调调节室温到 25°C, 待预计仪器也达到 25°C 后再开始测定 A_{412} 。

d. 每隔 2min 记录 A_{412} 值, 即 A_{412} (Time n), 至少连续记录 10min, 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 10min 或自动每隔 2min 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 10min 测定一次吸光度。

4. 样品中谷胱甘肽还原酶活力的计算：

a. 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°C, pH7.5 的条件下，在 1min 内可以还原化 1 μM GSSG。1 U=1000 mU。

b. 计算时每个样品的 A_{412}/min 都需要扣除相应的样品本底对照测定出来的 A_{412}/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 A_{412}/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。肝脏裂解样品的实测效果参考图 1。

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

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

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

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

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

即相当于： [检测体系中谷胱甘肽还原酶活力] = $(\Delta A_{412}/\text{min}) / (\epsilon^{\mu\text{M}} \times L(\text{cm})) = [(\Delta A_{412}(\text{sample}) - \Delta A_{412}(\text{blank}))/\text{min}] / (\epsilon^{\mu\text{M}} \times L(\text{cm}))$ [样品中谷胱甘肽还原酶活力] = [检测体系中消耗谷胱甘肽还原酶活力] × [稀释倍数] / [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 $0.01415 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ；

$L(\text{cm})$ 为测吸光度时的路径长度： 200 μL 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 为样品的稀释倍数；

$V(\text{mL})$ 为反应体系， 本反应体系为 0.2mL；

$V_{\text{sample}}(\text{mL})$ 为反应体系中样品的体积， 以 mL 表示。

d. 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 μL 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] = $(0.048 - 0.006) / (0.01415 \times 0.552) = 5.38\text{mU}/\text{mL}$

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

◆ 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°C 冻存待以后测定。
3. 一定要严格控制反应时的温度为 25°C，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。