CheKine™ 谷胱甘肽还原酶（GR）活性检测试剂盒（微量法）

货号: KTB1620　　规格: 96 T/96 S　96 T×5/480 S　　批号：见产品标签

	适用样本：动植物组织、细胞、细菌、血清（浆）
	保质期：-20℃，避光保存 12 个月

01 背景与原理

谷胱甘肽还原酶（Glutathione reductases, GR）（EC 1.6.4.2）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。

本试剂盒检测原理是 GR 能催化 NADPH 还原 GSSG 再生 GSH，同时 NADPH 脱氢生成 $NADP^+$；NADPH 在 340 nm 有特征吸收峰，相反 $NADP^+$在该波长无吸收峰；通过测定 340 nm 吸光度下降速率来测定 NADPH 脱氢速率，从而计算 GR 活性。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	96 T	96 T×5	
Assay Buffer	70 mL×2	70 mL×10	4℃
Substrate	2 mL	2 mL×5	4℃，避光保存
GR Cofactor	Powder×1 vial	Powder×5 vials	-20℃，避光保存

***请在实验前检查各组分的量。**

***各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。**

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 340 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	UV 板
试剂	PBS/去离子水	样本清洗用/试剂配制用
其他	匀浆器（组织样本）、恒温箱、冰盒、低温离心机、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- **正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。**
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，**请在实验全程做好生物安全防护**，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Assay Buffer	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Substrate	即用型；使用前平衡到室温	4℃避光保存
GR Cofactor	临用前配制；每管加入 2.4 mL 去离子水，混匀，现配现用	实验过程中避光冰上放置；用不完的试剂-20℃分装避光保存 1 个月，禁止反复冻融

05-2 样本制备

注意：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。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 Assay Buffer 后研磨或超声波处理，不能用细胞裂解液处理细胞。Assay Buffer 含有一定浓度的蛋白（约 1 mg/mL），如需测定蛋白浓度要减去 Assay Buffer 本身的蛋白含量。

- **动植物组织**：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL 预冷的 Assay Buffer，冰浴匀浆，10000 g，4℃离心 10 min，取上清置冰上待测。
- **细胞或细菌**：收集 5×10^6 个细胞或细菌，用预冷的 PBS 清洗细胞或细菌，800 g 离心 2 min，弃上清。加入 1 mL 预冷的 Assay Buffer 进行冰浴超声破碎。超声波破碎 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），10000 g，4℃离心 10 min，取上清置于冰上待测。
- **血清（浆）**：直接测定。

05-3 实验步骤

1. **酶标仪准备**：预热 30 min 以上，调节波长到 340 nm。
2. 检测前，Assay Buffer 置于 25℃（普通物种）或者 37℃（哺乳动物）中预热 30 min 以上。
3. **检测体系配制**：空白孔只需做 1 个即可。确保 180 s 内吸光值变化呈线性，哺乳动物组织一般须用 Assay Buffer 稀释 2-5 倍。因通过反应速率计算酶活，使用 96 孔 UV 板时请根据操作速度控制一次测定的样本数。在 96 孔 UV 板中按照如下方式加样：

试剂	空白孔（μL）	测定孔（μL）
样本	0	20
Assay Buffer	170	150
Substrate	10	10
GR Cofactor	20	20

4. **吸光度检测**：迅速混匀，立即测定 340 nm 处吸光值。记录第 10 s 和 190 s 时吸光值，分别记录为 A_1 和 A_2。测定孔记为 $A_{测定}$，空白孔记为 $A_{空白}$。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧**二维码**或访问官网[https://www.abbkine.cn] > 进入“**技术中心**”> 查找“**在线计算器**”工具。

06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算$\Delta A=A_1-A_2$，$\Delta A_{测定}=A_{1\,测定}-A_{2\,测定}$，$\Delta A_{空白}=A_{1\,空白}-A_{2\,空白}$，$\Delta\Delta A=\Delta A_{测定}-\Delta A_{空白}$

2. 样本 GR 活性计算

- 按蛋白浓度计算

活性单位定义：在 25℃或 37℃，pH 8.0 条件下，每毫克蛋白每分钟催化 1 μmol NADPH 氧化。

GR 酶活(U/mg prot)=$[\Delta\Delta A\div(\varepsilon\times d)\times V_{反总}\times10^6]\div(Cpr\times V_{样})\div T$**=1.072×ΔΔA÷Cpr**

- 按样本鲜重计算

活性单位定义：在在 25℃或 37℃，pH 8.0 条件下，每克样品每分钟催化 1 μmol NADPH 氧化。

GR 酶活(U/g)=$[\Delta\Delta A\div(\varepsilon\times d)\times V_{反总}\times10^6]\div(V_{样}\div V_{样总}\times W)\div T$**=1.072×ΔΔA÷W**

- 按细胞或细菌数量计算

活性单位定义：在 25℃或 37℃，pH 8.0 条件下，每 10^4 个细胞或细菌每分钟催化 1 μmol NADPH 氧化。

GR 酶活(U/10^4)=$[\Delta\Delta A\div(\varepsilon\times d)\times V_{反总}\times10^6]\div(N\times V_{样}\div V_{样总})\div T$**=1.072×ΔΔA÷N**

- 按液体体积计算

活性单位定义：在 25℃或 37℃，pH 8.0 条件下，每毫升液体每分钟催化 1 μmol NADPH 氧化。

GR 酶活(U/mL)=$[\Delta\Delta A\div(\varepsilon\times d)\times V_{反总}\times10^6]\div V_{样}\div T$**=1.072×ΔΔA**

ε：NADPH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L/mol/cm；d：96 孔 UV 板光径，0.5 cm；$V_{反总}$：反应体系总体积，200 μL=2×10^{-4} L；10^6：单位换算系数，1 mol=1×10^6 μmol；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，20 μL=2×10^{-2} mL；$V_{样总}$：提取液体积，1 mL；T：反应时间，3 min；N：细胞或细菌数量，以 10^4 为单位（例如细胞数量为 5×10^6，N=500）。

07 结果展示

示例-1：取 0.1 g 小鼠肝脏，按照测定步骤操作，用 96 孔 UV 板进行检测。测得$\Delta A_{测定}=A1_{测定}-A2_{测定}$ =0.664-0.487=0.177，$\Delta A_{空白}=A1_{空白}-A2_{空白}$=0.288-0.286=0.002，$\Delta\Delta A=\Delta A_{测定}-\Delta A_{空白}$=0.177-0.002=0.175。按样本质量计算得：GR 酶活(U/g)=1.072×ΔΔA÷W=1.876 U/g。

08 FAQ

- **检测得到的样本ΔΔA 过高或者过低怎么办?**

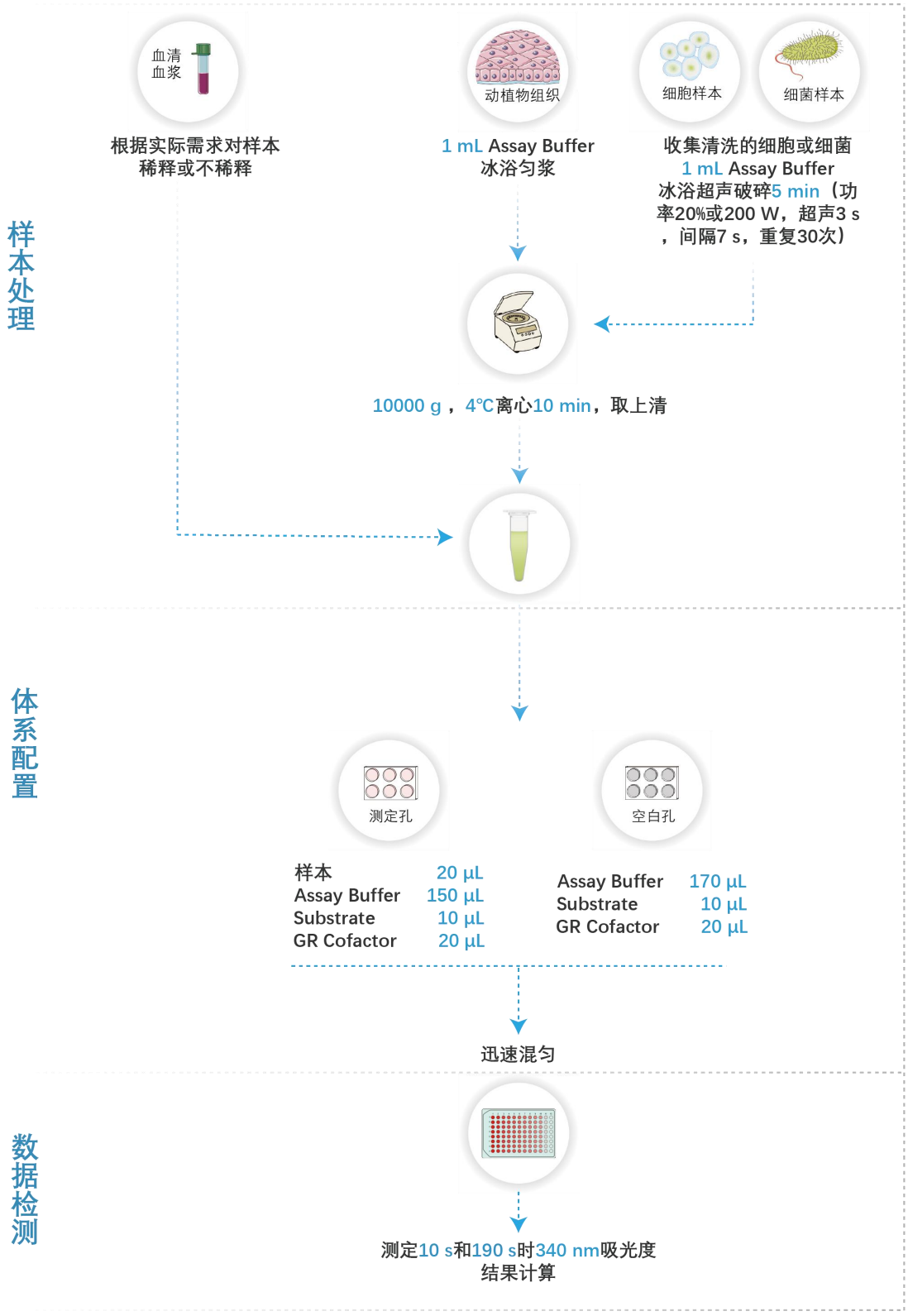
如果ΔΔA 小于 0.02 可适当加大样本量。如果ΔΔA 大于 1.0，样本可用 Assay Buffer 进一步稀释，或减少提取用样本量，再重新进行测定。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1600	CheKine™ 还原型谷胱甘肽（GSH）检测试剂盒（微量法）
KTB1610	CheKine™ 氧化型谷胱甘肽（GSSG）含量检测试剂盒（微量法）
KTB1630	CheKine™ 谷胱甘肽 S-转移酶（GST）检测试剂盒（微量法）
KTB1640	CheKine™ 谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1650	CheKine™ 硫氧还蛋白还原酶（TrxR）检测试剂盒（微量法）
KTB1660	CheKine™ 硫氧还蛋白过氧化物酶（TPX）检测试剂盒（微量法）

CheKine™ 谷胱甘肽还原酶（GR）活性检测流程示意图

（Abbkine 货号：KTB1620）



V1.0