

组织及血液谷胱甘肽还原酶（GR）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AMHB7-C48	组织及血液谷胱甘肽还原酶（GR）试剂盒检测试剂盒	48T	常量法

产品说明:

GR (EC1.8.1.7, Glutathione Reductase, 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TrxR 取代)。GR 催化NADPH 还原GSSG 生成GSH, 有助于维持体内GSH/GSSG 比值。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。

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。

试剂组成:

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1瓶	2-8℃保存
试剂三	粉剂×1瓶	2-8℃保存

溶液的配制:

- 1、试剂二: 临用前加入3mL 蒸馏水溶解备用, 2-8℃可保存4 周;
- 2、试剂三: 试剂存于试剂瓶内玻璃瓶中; 临用前加入6mL 蒸馏水溶解备用, -20℃可分装保存4 周, 避免反复冻融。

操作步骤:

一、样本处理

1. 组织: 按照组织质量(g): 试剂一体积(mL)为 1: 5~10 的比例(建议称取约0.1g 组织, 加入 1mL 试剂一) 进行冰浴匀浆。10000rpm, 4℃离心 10min, 取上清置冰上待检测。
2. 细菌、细胞: 按照细胞数量(10⁴ 个): 试剂一体积(mL) 为 500~1000: 1 的比例(建议500 万细胞加入 1mL 试剂一), 冰浴超声波破碎细胞(功率 300w, 超声 3s, 间隔 7s, 总时间 3min), 然后 10000rpm, 4℃, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。

3. 血清（血浆）等液体：直接测定。

二、测定步骤

1. 紫外分光光度计预热30min 以上，调节波长到340nm，蒸馏水调零。

2. 根据样本量取部分试剂一置于 37℃中预热 15min 以上。

3. 操作表：（在微量石英比色皿或96 孔UV 板中加入下列试剂）

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
试剂二	50	50
试剂三	100	100
样本	100	-
试剂一	750	850

将上述试剂分别加入石英比色皿后迅速吹打混匀，记录第 10s 处340nm 的吸光值A 空 1 (A 测 1)，迅速置于37℃水浴或培养箱3min，拿出迅速擦干测定3min10s 时的吸光值A 空2 (A 测2)，计算 ΔA 空白管=A 空 1-A 空2， ΔA 测定管=A 测 1-A 测2。空白管只需测 1-2 次。

三、GR 活性计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

活性单位定义：在37℃，pH 8.0 条件下，每毫克蛋白每分钟催化 1μmol NADPH 氧化为一个酶活力单位。GR 酶活(U/mg prot)= $[(\Delta A \text{ 测定管}-\Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T$

$$=0.536 \times (\Delta A \text{ 测定管}-\Delta A \text{ 空白管}) \div Cpr$$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：在37℃，pH 8.0 条件下，每克样本每分钟催化 1μmol NADPH 氧化为一个酶活力单位。GR 酶活(U/g 质量)= $[(\Delta A \text{ 测定管}-\Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T$

$$=0.536 \times (\Delta A \text{ 测定管}-\Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：在37℃，pH 8.0 条件下，每 10⁴ 个细胞每分钟催化 1μmol NADPH 氧化为一个酶活力单位。GST 活性 (U/10⁴ cell) = $[(\Delta A \text{ 测定管}-\Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V \text{ 反总}] \div (N \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$

$$=0.536 \times (\Delta A \text{ 测定管}-\Delta A \text{ 空白管}) \div N$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：在37℃，pH 8.0 条件下，每毫升液体每分钟催化 1μmol NADPH 氧化为一个酶活力单位。

$$\text{GST 活性 (U/mL)} = [(\Delta A \text{ 测定管}-\Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V \text{ 反总}] \div V \text{ 样} \div T = 0.536 \times (\Delta A \text{ 测定管}-\Delta A \text{ 空白管})$$

ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10³L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 反总: 反应体系总体积, 1000μL=0.001L; 10⁶: 单位换算系数, 1mol=10⁶μmol; Cpr: 上清液蛋白浓度, mg/mL; V 样: 加入反应体系中上清液体积, 100μL=0.1mL; V 样总: 样本总体积, 1mL; T: 反应时间, 3min; W: 样本质量, g; N: 细胞数量, 以万计。

注意事项:

- 1、样本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、测定前须先用 1-2 个样做预实验，哺乳动物组织一般须用试剂一稀释2-5 倍；
- 3、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。