

# 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-M96	组织及血液谷胱甘肽还原酶（GR） 检测试剂盒	96T	微量法

## 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<sup>+</sup>；NADPH在340nm有特征吸收峰，相反NADP<sup>+</sup>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 125 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1支	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 1.5mL 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3 mL 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 ( $10^4$  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. 分光光度计或酶标仪预热 30 min 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	10	10
试剂三	20	20
样本	20	-
试剂一	150	170

将上述试剂分别加入微量石英比色皿或 96 孔板后迅速吹打混匀, 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 (酶标仪有控温功能的可以调节温度至 37℃), 拿出迅速擦干 测定 3min 10s 时的吸光值 A 空 2 (A 测 2), 计算  $\Delta A$  空白管 = A 空 1 - A 空 2,  $\Delta A$  测定管 = A 测 1 - A 测 2。空白管只需测 1-2 次。

## 三、GR 活性计算

### a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

#### (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  $1\mu\text{mol}$  NADPH 氧化为一个酶活力单位。GR 酶活 (U/mg prot) =  $[(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (C_{\text{pr}} \times V \text{ 样}) \div T$

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

#### (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  $1\mu\text{mol}$  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  $10^4$  个细胞每分钟催化  $1\mu\text{mol}$  NADPH 氧化为一个酶活力单位。GST 活性 (U/ $10^4$  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  $1\mu\text{mol}$  NADPH 氧化为一个酶活力单位。

---

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

$\epsilon$ : NADPH 摩尔消光系数  $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ;  $d$ : 比色皿光径,  $1 \text{ cm}$ ;  $V$  反总: 反应体系总体积,  $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ;  $10^6$ : 单位换算系数,  $1 \text{ mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$ ;  $C_{pr}$ : 上清液蛋白浓度,  $\text{mg/mL}$ ;  $W$ : 样本质量,  $\text{g}$ ;  $V$  样: 加入反应体系中的样本体积,  $20 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-2} \text{ mL}$ ;  $V$  样总: 样本总体积,  $1 \text{ mL}$ ;  $T$ : 反应时间,  $3 \text{ min}$ ;  $N$ : 细胞数量, 以万计。

(2) 按样本质量计算

活性单位定义: 在  $37^\circ\text{C}$ 、 $\text{pH } 8.0$  条件下, 每克样本每分钟催化  $1 \mu\text{mol}$  NADPH 氧化为一个酶活力单位。GR 酶活  $(\text{U/g 质量}) = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T = 0.893 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$

(3) 按细胞数量计算:

活性单位定义: 在  $37^\circ\text{C}$ 、 $\text{pH } 8.0$  条件下, 每  $10^4$  个细胞每分钟催化  $1 \mu\text{mol}$  NADPH 氧化为一个酶活单位。GST 活性  $(\text{U}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V \text{ 反总}] \div (N \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.893 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div N$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义: 在  $37^\circ\text{C}$ 、 $\text{pH } 8.0$  条件下, 每毫升液体每分钟催化  $1 \mu\text{mol}$  NADPH 氧化为一个酶活单位。

$$\text{GST 活性 (U/mL)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V \text{ 反总}] \div V \text{ 样} \div T = 0.893 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管})$$

$\epsilon$ : NADPH 摩尔消光系数  $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ;  $d$ : 96 孔板光径,  $0.6 \text{ cm}$ ;  $V$  反总: 反应体系总体积,  $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ;  $10^6$ : 单位换算系数,  $1 \text{ mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$ ;  $C_{pr}$ : 上清液蛋白浓度,  $\text{mg/mL}$ ;  $W$ : 样本质量,  $\text{g}$ ;  $V$  样: 加入反应体系中的样本体积,  $20 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-2} \text{ mL}$ ;  $V$  样总: 样本总体积,  $1 \text{ mL}$ ;  $T$ : 反应时间,  $3 \text{ min}$ ;  $N$ : 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  $0.1 \text{ mg/mL}$ ), 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。