

谷胱甘肽还原酶(GR)活性检测试剂盒说明书

Glutathion Reductases Assay Kit

微量法

货号：AK093

规格：100T/96S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
AK093-A	120mL×1 瓶	4℃保存；
AK093-B	粉剂×1 瓶	4℃保存。临用前加入 2.0 mL 蒸馏水，混匀；
AK093-C	1ml×1 瓶	4℃保存；

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介：

意义：谷胱甘肽还原酶 (Glutathion Reductases, 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。

原理：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。

自备用品：

紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板)、水浴锅、可调式移液枪、研钵、冰和双蒸水。

粗酶液提取：

1. 细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量 (10⁴ 个)：AK093-A 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL AK093-A，超声波破碎细菌或细胞 (冰浴，功率 300W，超声 3s，间隔 7s，总时间 3min)；然后 8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
2. 组织：称取约 0.1g 组织，加入 1mL AK093-A，进行冰浴匀浆。8000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
3. 血清 (浆) 样品：直接检测。

测定步骤：

1. 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
2. AK093-A 置于 25℃ (普通物质) 或者 37℃ (哺乳动物) 水浴中预热 30min。
3. 样本测定按下表依次加入下列试剂：

试剂名称	测定管 (ul)	空白管 (ul)
AK093-A		170
AK093-B		20
AK093-C		10
充分混匀，于 340nm 处测定 10s 和 190s 吸光度，记为 A 空 1 和 A 空 2， ΔA 空白管 = A 空 1 - A 空 2。		
AK093-A	150	

AK093-B	20	
待测样本(上清液)	20	
AK093-C	10	
充分混匀后于 340nm 处测定第 10s 和第 190s 的吸光值, 分别记为 A 测 1 和 A 测 2, ΔA 测定管= A 测 1 - A 测 2。		

注意: 空白管只需测定一次。

GR 酶活性计算:

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 按蛋白浓度计算

活性单位定义: 一定温度中, pH8.0 条件下, 每 mg 蛋白每分钟催化 $1\mu\text{mol}$ NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{计算公式: GR (U/mg prot)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T \\ = 0.536 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

2. 按样本质量计算

活力单位定义: 一定温度中, pH8.0 条件下, 每 g 样本每分钟催化 $1\mu\text{mol}$ NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{计算公式: GR (U/g)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 0.536 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

3. 按细胞数量计算

活性单位定义: 一定温度中, pH8.0 条件下, 每 10^4 个细胞每分钟催化 $1\mu\text{mol}$ NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{计算公式: GR (U/} 10^4 \text{ cell)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 0.536 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量}$$

4. 按液体体积计算

活性单位定义: 一定温度中, pH8.0 条件下, 每毫升液体每分钟催化 $1\mu\text{mol}$ NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

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

注: ϵ : NADPH 摩尔消光系数 $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d: 比色皿光径, 1 cm; V 反总: 反应体系总体积, $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$; 10^6 : $1 \text{ mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; Cpr: 上清液蛋白浓度 (mg/mL); W: 样品质量; V 样: 加入反应体系中上清液体积, $20 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-2} \text{ mL}$; V 样总: 提取液体积, 1 mL; V 样总: 提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 3 min。

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下

1. 按蛋白浓度计算

活性单位定义: 在一定温度中, pH8.0 条件下, 每毫克蛋白每分钟催化 $1\mu\text{mol}$ NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{GR 酶活 (U/mg prot)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T \\ = 1.072 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

2. 按样本质量计算

活性单位定义: 在一定温度中, pH8.0 条件下, 每克样本每分钟催化 $1\mu\text{mol}$ NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{GR 酶活 (U/g)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 1.072 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

3. 按细胞数量计算

活性单位定义：在一定温度中，pH8.0 条件下，每 10^4 个细胞每分钟催化 $1\mu\text{mol}$ NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{GR 酶活 (U/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 1.072 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量}$$

4. 按液体体积计算

活性单位定义：在一定温度中，pH8.0 条件下，每毫升液体每分钟催化 $1\mu\text{mol}$ NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{GR 酶活 (U/mL)} &= [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div \times V \text{ 样} \div T \\ &= 1.072 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \end{aligned}$$

注： ϵ ：NADPH 摩尔消光系数 $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d ：96 孔板光径， 0.5 cm ； $V \text{ 反总}$ ：反应体系总体积， $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ； 10^6 ： $1 \text{ mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$ ； C_{pr} ：上清液蛋白浓度 (mg/mL)； W ：样品质量； $V \text{ 样}$ ：加入反应体系中上清液体积， $20 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-2} \text{ mL}$ ； $V \text{ 样总}$ ：提取液体积， 1 mL ； $V \text{ 样总}$ ：提取液体积， 1 mL ； T ：反应时间， 3 min 。

注意事项：

1. 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；
2. AK093-B 须临用前配制，配制完后，置于冰上，未使用完的 4°C 保存，三天内使用完。
3. 测定前须先用 1~2 个样做预实验，确保 180s 内吸光值变化呈线性，哺乳动物组织一般须用 AK093-A 稀释 2~5 倍；
4. 细胞中 GR 活性测定时，细胞数目须在 300 万-500 万之间，细胞中 GR 的提取时可加 AK093-A 后研磨或超声波处理，不能用细胞裂解液处理细胞。
5. AK093-A 中含有一定浓度的蛋白（约 0.1 mg/mL ），测定样品蛋白浓度时需减去本身的蛋白含量。