# 谷胱甘肽还原酶（GR）活性测定试剂盒说明书

**微量法 100T/96S**

**注　　意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。**

**测定意义：**

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，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。

**测定原理：**

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。

**自备仪器和用品：**

低温离心机、水浴锅、移液器、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、和蒸馏水

**试剂组成和配置：**

试剂一：液体 120mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：粉剂×2 支，-20℃保存。临用前加入 1.2mL 蒸馏水，混匀。

试剂三：粉剂×2 支，-20℃保存。临用前加入 0.6mL 蒸馏水，混匀。

**粗酶液提取：**

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。8000g，4℃离心 15min，取上清，置冰上待测。

2. 细菌、真菌：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 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 8000g，4℃，离心 15min，取上清置于冰上待测。

3. 血清等液体：直接测定。

**操作步骤：**

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min，调节波长到 340 nm，蒸馏水调零。
2. 试剂一置于 25℃（普通物质）或者 37℃（哺乳动物）中预热 30min。
3. **测定管：**取微量石英比色皿或 96 孔板，**依次**加入 10μL 试剂三，20μL 试剂二，150μL 试剂一，20μL 上清液，**混匀，**于 340nm 迅速测定初始吸光度和 180 s 吸光度，记为 A 测 1 和 A 测 2，△A 测定管= A 测 1 - A 测 2。

**注 意：**

1.加完上清液后必须迅速混匀测定，保证准确测出初始反应速度；

2.当出现初始 180s 内吸光值不稳定时，可以适当延长反应时间，选取相对稳定的时间段内吸光值变化值；

3.当所测△A 测定管的值在零点附近徘徊时，可能原因：（1）样本 GR 酶活性低，建议浓缩样本后再进行测定；（2）样本 GR 酶活性过高，吸光值变化区间过小无法准确测出，建议样本稀释 2~5 倍后再进行测定)

**计算公式：**

**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：在一定温度中，pH8.0 条件下，每毫克蛋白每分钟催化 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

GR 酶活(nmol/min/mg prot)= [ △A 测定管÷ε÷d×V 反总×$10^9$]÷[Cpr×V 样]÷T

= 536×△A 测定管÷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 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

GR 酶活(nmol/min/g 鲜重)= [ △A 测定管÷ε÷d×V 反总×$10^9$] ÷(W×V 样÷V 样总)÷T

= 536×△A 测定管÷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 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

GR 酶活(nmol/min/$10^4$ cell)= [ △A 测定管÷ε÷d×V 反总×$10^9$] ÷(细胞数量×V 样÷V 样总)÷T

= 536×△A 测定管÷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 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

GR 酶活(nmol/min/mL)= [ △A 测定管÷ε÷d×V 反总×$10^9$]÷×V 样÷T

= 536×△A 测定管

ε：NADPH 摩尔消光系数 6.22×$10^3$L/mol/cm；d：比色皿光径，1 cm；V 反总：反应体系总体积，200μL=2×$10^{-4}$ L；$10^6$：1 mol=1×$10^6$μmol； 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，20μL =2×$10^{-2}$ 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 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

GR 酶活(nmol/min/mg prot)= [ △A 测定管÷ε÷d×V 反总×$10^9$]÷[Cpr×V 样]÷T

= 1072×△A 测定管÷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 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

GR 酶活(nmol/min/g 鲜重)= [ △A 测定管÷ε÷d×V 反总×$10^9$] ÷(W×V 样÷V 样总)÷T

= 1072×△A 测定管÷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 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

GR 酶活(nmol/min/$10^4$ cell)= [ △A 测定管÷ε÷d×V 反总×$10^9$] ÷(细胞数量×V 样÷V 样总)÷T

=1072×△A 测定管÷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 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

GR 酶活(nmol/min/mL)= [ (△A 测定管-△A 空白管)÷ε÷d×V 反总×$10^9$]÷×V 样÷T

=1072×△A 测定管

ε：NADPH 摩尔消光系数 6.22×$10^3$L/mol/cm；d：96 孔板光径，0.5 cm；V 反总：反应体系总体积，200μL=2×$10^{-4}$

L；$10^6$：1 mol=1×$10^6$μmol； 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，20μL =2×$10^{-2}$ 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。

**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）试剂二和试剂三须现配现用，配制完后，置于冰上，未使用完的 4℃保存，三天内使用完。

（3）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。

（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 的提取时可加试剂一后研磨或超声波处理，不能用细胞裂解液处理细胞。