

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（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 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 10 μ L 试剂三, 20 μ L 试剂二, 150 μ L 试剂一, 20 μ L 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, ΔA 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 ΔA 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。

$$\text{GR 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \text{ 测定管} \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div [\text{Cpr} \times V \text{ 样}] \div T \\ = 536 \times \Delta A \text{ 测定管} \div \text{Cpr}$$

(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 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{GR 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \text{ 测定管} \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 536 \times \Delta A \text{ 测定管} \div W$$

(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 10⁴ 个细胞每分钟催化 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{GR 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \text{ 测定管} \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 536 \times \Delta A \text{ 测定管} \div \text{细胞数量}$$

(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 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{GR 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \text{ 测定管} \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T \\ = 536 \times \Delta A \text{ 测定管}$$

ϵ : NADPH 摩尔消光系数 6.22 $\times 10^3$ L/mol/cm; d : 比色皿光径, 1 cm; V 反总: 反应体系总体积, 200 μ L=2 $\times 10^{-4}$ L; 10⁶: 1 mol=1 $\times 10^6$ μ 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 μ L =2 $\times 10^{-2}$ 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。

$$\text{GR 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \text{ 测定管} \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div [\text{Cpr} \times V \text{ 样}] \div T \\ = 1072 \times \Delta A \text{ 测定管} \div \text{Cpr}$$

(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 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{GR 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \text{ 测定管} \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 1072 \times \Delta A \text{ 测定管} \div W$$

(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 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{GR 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \text{ 测定管} \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 1072 \times \Delta A \text{ 测定管} \div \text{细胞数量}$$

(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 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{GR 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T \\ = 1072 \times \Delta A \text{ 测定管}$$

ϵ : NADPH 摩尔消光系数 $6.22 \times 10^3 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$; d : 96 孔板光径, 0.5 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。

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°C 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