

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， 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。

$$\begin{aligned}\text{GR酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [\Delta A_{\text{测定管}} \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div [C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}] \div T \\ &= 536 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

(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。

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

(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。

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

(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。

$$\begin{aligned}\text{GR酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) &= [\Delta A_{\text{测定管}} \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 536 \times \Delta A_{\text{测定管}}\end{aligned}$$

ϵ : NADPH摩尔消光系数 $6.22 \times 10^3 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$; d : 比色皿光径, 1 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; $V_{\text{样}}$: 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。

$$\begin{aligned}\text{GR酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [\Delta A_{\text{测定管}} \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div [C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}] \div T \\ &= 1072 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

(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。

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

(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。

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

$$= 1072 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \text{细胞数量}$$

(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; $V_{\text{反总}}$: 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) 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理细胞。