

谷胱甘肽还原酶（GR）活性测定试剂盒说明书

（货号：ADS-W-FM029 微板法 96 样）

一、产品简介：

谷胱甘肽还原酶（GR，EC 1.6.4.2）是在动植物中都有发现，是一类黄素蛋白氧化还原酶，催化氧化型谷胱甘肽(GSSG)还原成还原型谷胱甘肽（GSH），GSH / GSSG的比率越高，则越能清除氧化胁迫过程中产生的活性氧，因此，GR酶活性高低是衡量氧化应激能力的一个重要指标。

本试剂盒采用Ellman方法，DTNB与GR中GSSG还原产生的GSH反应，生成黄色产物（TNB）。该产物在412nm出有最大吸收。TNB生成量和GR活性成线性正相关，可通过测定412nm处吸光值计算出谷胱甘肽还原酶（GR）的活性水平。该方法在可见光下测定，检测产物相对传统测试方法灵敏度高、测定物更稳定、可操作性更强。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂 A	液体 0.6mL×1 支	4℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部，避免试剂浪费。
试剂 B	粉剂 EP 管×1 支	-20℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部，再加 0.55 mL 蒸馏水溶解备用，现配现用。
试剂一	粉剂 1 瓶	4℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部，再加 10mL 蒸馏水溶解。
试剂二	粉剂 1 支	4℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部，再加 1.1mL 蒸馏水溶解；溶解后-20℃保存 2 周。
试剂三	液体 1.5mL×1 支	4℃保存	固体出现可以 25℃水浴 5min,使其呈液体状态。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、低温离心机、水浴锅、移液器、蒸馏水

四、谷胱甘肽还原酶（GR）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备

① 组织样本：

称取约 0.1g 组织（水分充足样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液，在 4℃ 或冰浴匀浆(或使用各类常见电动匀浆器)。4℃ 约 12,000rpm 离心 10min，取上清待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量(g)：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，在 4℃ 或冰浴进行匀浆(或使用各类常见电动匀浆器)。4℃ 约 12,000rpm 离心 10min，取上清待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量(10^4)：提取液(mL)为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：直接测定。若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测

- ① 酶标仪预热 30 min, 设置温度在 25°C, 设定波长到 412 nm。
- ② 所有试剂在使用前解冻在室温或 25°C 水浴锅中温育 10min。在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
试剂一	100
提取液	60
样本	20
试剂二	10
试剂三	10
立即混匀, 于412nm波长下30s时读取A1, 室温 (25°C) 条件下孵育10min后再读取A2; $\Delta A = A2 - A1$ 。	

- 【注】:** 1、若 ΔA 小于 0.01, 可延长反应时间 T (如延长到 20min 后读 A2) 或增加 V1 (如由 20μL 增至 50μL, 则提取液相应减少), 则改变后的 T 和 V1 代入公式重新计算; 若所测 ΔA 值依然在零点附近徘徊, 可能样本 GR 酶活性低, 建议浓缩样本后再进行测定;
- 2、 ΔA 每分钟变化宜在 0.005-0.1, 若样本 GR 酶活性过高, 建议样本稀释 2~5 倍后再进行测定。
- 3、若 A1 值大于 1.5 且 ΔA 又小于 0.01, 则样本中可能含有高浓度 GSH 等还原性物质且该酶活性比较低; 可先取 200μL 离心后的上清液或澄清液体样本至新 EP 管中, 先加 5μL 试剂 A, 混匀后于 25°C 静置 5min; 再加 5μL 试剂 B, 混匀后于 25°C 静置 5min。该混合液再做为样本进行测定, 则所有的计算公式再统一乘以 1.05(样本的扩大倍数)。
- 4、本试剂盒检测时牵涉到氧化还原反应, 所有氧化剂或还原剂都会干扰本试剂盒的测定, 另外硫酸钠、硫酸铵和铁氰化物都会干扰本试剂盒的测定。请尽量避免。

五、结果计算:

1、按蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克蛋白每分钟还原 1nmol GSSG 生成 2nmol GSH 为 1 个酶活单位。

$$\text{GR 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \div 2 \times 10^9 \times V2) \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \times D = 73.5 \times \Delta A \div \text{Cpr} \times D$$

2、按样本质量计算:

酶活定义: 每克样本每分钟还原 1nmol GSSG 生成 2nmol GSH 为 1 个酶活单位。

$$\text{GR 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \div 2 \times 10^9 \times V2) \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 73.5 \times \Delta A \div W \times D$$

3、按细胞/细菌数量计算:

酶活定义: 每 10^4 个细胞/细菌每分钟还原 1nmol GSSG 生成 2nmol GSH 为 1 个酶活单位。

$$\text{GR 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \div 2 \times 10^9 \times V2) \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.147 \times \Delta A$$

4、按液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体每分钟还原 1nmol GSSG 生成 2nmol GSH 为 1 个酶活单位。

$$\text{GR 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \div 2 \times 10^9 \times V2) \div V1 \div T = 73.5 \times \Delta A$$

ϵ ---TNB 摩尔消光系数, $1.36 \times 10^4 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$; d ---光径, 0.5 cm; 2 ---1μmol GSSG 生成 2μmol GSH;
 V ---提取液体积, 1 mL; $V1$ ---加入体系中样本体积, $20\mu\text{L} = 2 \times 10^{-2} \text{ mL}$; W ---样本质量, g;
 $V2$ ---反应体系总体积, $200\mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$; D ---稀释倍数, 未稀释, 即为 1; T ---反应时间, 10min;
 Cpr ---上清液蛋白浓度 (mg/mL); 建议使用本公司 BCA 蛋白质含量检测试剂盒;