

谷胱甘肽还原酶（GR）活性测定试剂盒说明书

（货号：ADS-W-FM029-48 微板法 48 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂 A	液体 0.3mL×1 支	4℃避光保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底，避免试剂浪费； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂 B	粉剂 EP 管×1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 0.275 mL 蒸馏水溶解备用，现配现用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂一	粉剂 1 瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 5mL 蒸馏水溶解； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉剂 1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 0.55mL 蒸馏水溶解；溶解后 -20℃保存 2 周。
试剂三	液体 0.75mL×1 支	4℃避光保存	1. 固体出现可以 25℃水浴 5min，使其呈液体状态； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取

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°C 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°C 或冰浴进行匀浆(或使用各类常见电动匀浆器)。4°C 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、检测步骤

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:

试剂组分 (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。

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

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。

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

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。

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

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。

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

ϵ ---TNB 摩尔消光系数, 1.36×10^4 L/mol/cm; d ---光径, 0.5 cm; 2 --- $1\mu\text{mol}$ GSSG 生成 $2\mu\text{mol}$ GSH;
 V ---提取液体积, 1 mL; V_1 ---加入体系中样本体积, $20\mu\text{L} = 2 \times 10^{-2}$ mL; W ---样本质量, g;
 V_2 ---反应体系总体积, $200\mu\text{L} = 2 \times 10^{-4}$ L; D ---稀释倍数, 未稀释, 即为 1; T ---反应时间, 10min;
 C_{pr} ---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;