

谷胱甘肽还原酶（GR）检测试剂盒（微量法）

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。

试剂组成和配制：

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：

- 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。
- 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。
- 血清等液体：**直接测定。

测定步骤：

- 分光光度计/酶标仪预热 30 min，调节波长到 340 nm，蒸馏水调零。
- 试剂一置于 25℃（普通物质）或者 37℃（哺乳动物）中预热 30min。
- 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：

- 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；
- 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；
- 当所测 ΔA 测定管的值在零点附近徘徊时，可能原因：
 - 样本 GR 酶活性低，建议浓缩样本后再进行测定；
 - 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。
$$\text{GR 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \text{ 测定管} \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div [Cpr \times V \text{ 样}] \div T$$
$$= 536 \times \Delta A \text{ 测定管} \div Cpr$$

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

(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。GR 酶活(nmol/min/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 $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$;

d : 比色皿光径, 1 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。

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) = $[\Delta A \text{ 测定管} \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div [\text{Cpr} \times V \text{ 样}] \div T$
 $= 1072 \times \Delta A \text{ 测定管} \div \text{Cpr}$

(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。GR 酶活(nmol/min/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。GR 酶活(nmol/min/ 10^4 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。GR 酶活(nmol/min/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 $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$;

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理细胞。