

谷胱甘肽还原酶（GR）活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC1165

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 125 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 支	2-8℃保存
试剂三	粉剂×1 瓶	2-8℃保存

溶液的配制：

1. 试剂二：临用前加入 1.5mL 蒸馏水溶解备用，2-8℃可保存 4 周；
2. 试剂三：试剂存于试剂瓶内玻璃瓶中；临用前加入 3 mL 蒸馏水溶解备用，-20℃可分装保存 4 周，避免反复冻融。

产品说明：

GR (EC1.8.1.7, Glutathione Reductase, 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，GR 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。

GR 能催化 NADPH 还原 GSSG 再生 GSH，同时 NADPH 脱氢生成 NADP⁺；NADPH 在 340nm 有特征吸收峰，相反 NADP⁺在该波长无吸收峰；通过测定 340nm 吸光度下降速率来测定 NADPH 脱氢速率，从而计算 GR 活性。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、移液器、匀浆器/研钵/细胞超声破碎仪、微量石英比色皿/96 孔 UV 板、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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。10000rpm，4℃离心 10min，取上清置冰上待检测。
2. 细菌、细胞：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），冰浴超声破碎细胞（功率 300w，超声 3s，间隔 7s，总时间 3min），然后 10000rpm，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。
3. 血清（血浆）等液体：直接测定。

二、测定步骤

1. 分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长到 340nm，蒸馏水调零。
2. 根据样本量取部分试剂一置于 37°C 中预热 15min 以上。
3. 操作表：（在微量石英比色皿或 96 孔 UV 板中加入下列试剂）

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
试剂二	10	10
试剂三	20	20
样本	20	-
试剂一	150	170

将上述试剂分别加入微量石英比色皿或 96 孔板后迅速吹打混匀，记录第 10s 处 340nm 的吸光值 A 空 1 (A 测 1)，迅速置于 37°C 水浴或培养箱 3min (酶标仪有控温功能的可以调节温度至 37°C)，拿出迅速擦干测定 3min10s 时的吸光值 A 空 2 (A 测 2)，计算 ΔA 空白管=A 空 1-A 空 2， ΔA 测定管=A 测 1-A 测 2。空白管只需测 1-2 次。

三、GR 活性计算

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算

活性单位定义：在 37°C，pH 8.0 条件下，每毫克蛋白每分钟催化 1μmol NADPH 氧化为一个酶活力单位。

$$\text{GR 酶活(U/mg prot)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T$$

$$= 0.536 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：在 37°C，pH 8.0 条件下，每克样本每分钟催化 1μmol NADPH 氧化为一个酶活力单位。

$$\text{GR 酶活(U/g 质量)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T$$

$$= 0.536 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：在 37°C，pH 8.0 条件下，每 10⁴ 个细胞每分钟催化 1μmol NADPH 氧化为一个酶活力单位。

$$\text{GST 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V \text{ 反总}] \div (N \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$

$$= 0.536 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div N$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：在 37°C，pH 8.0 条件下，每毫升液体每分钟催化 1μmol NADPH 氧化为一个酶活力单位。

$$\text{GST 活性 (U/mL)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V \text{ 反总}] \div V \text{ 样} \div T$$

$$= 0.536 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管})$$

ϵ : NADPH 摩尔消光系数 6.22×10³L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 反总: 反应体系总体积, 200μL=2×10⁻⁴L; 10⁶: 单位换算系数, 1mol=1×10⁶μmol; Cpr: 上清液蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; V 样: 加入反应体系中的样本体积, 20μL=2×10⁻²mL; V 样总: 样本总体积, 1mL; T: 反应时间, 3min; N: 细胞数量, 以万计。

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 37°C、pH 8.0 条件下，每毫克蛋白每分钟催化 1μmol NADPH 氧化为一个酶活力单位。

$$\text{GR 酶活(U/mg prot)} = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T$$

$$= 0.893 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：在 37°C、pH 8.0 条件下，每克样本每分钟催化 1 μ mol NADPH 氧化为一个酶活力单位。

$$\text{GR 酶活(U/g 质量)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T \\ = 0.893 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

(3) 按细胞数量计算：

活性单位定义：在 37°C、pH 8.0 条件下，每 10⁴ 个细胞每分钟催化 1 μ mol NADPH 氧化为一个酶活单位。

$$\text{GST 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V \text{ 反总}] \div (N \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 0.893 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div N$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：在 37°C、pH 8.0 条件下，每毫升液体每分钟催化 1 μ mol NADPH 氧化为一个酶活单位。

$$\text{GST 活性 (U/mL)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times 10^6 \times V \text{ 反总}] \div V \text{ 样} \div T \\ = 0.893 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管})$$

ϵ : NADPH 摩尔消光系数 6.22 $\times 10^3$ L/mol/cm; d : 96 孔板光径, 0.6cm; V 反总: 反应体系总体积, 200 μ L=2 $\times 10^4$ L; 10⁶: 单位换算系数, 1mol=1 $\times 10^6$ μ mol; C_{pr} : 上清液蛋白浓度, mg/mL; W : 样本质量, g; V 样: 加入反应体系中的样本体积, 20 μ L=2 $\times 10^{-2}$ mL; V 样总: 样本总体积, 1mL; T : 反应时间, 3min; N : 细胞数量, 以万计。

注意事项:

- 1、样本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、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；
- 3、由于试剂一中含有一定浓度的蛋白（约 0.1mg/mL），所以在测定样本蛋白浓度时需要减去试剂一本身的蛋白含量。

实验实例:

- 1、取 0.1g 桃树叶加入 1.0 mL 试剂一，冰上充分研磨，10000rpm 4°C 离心 10min，取上清液稀释 4 倍后按测定步骤检测，用微量石英比色皿测得 ΔA 测定管=A 测 1-A 测 2=1.0765-0.626=0.4505， ΔA 空白管=A 空 1-A 空 2=0，按样本质量计算酶活得：

$$\text{GR 酶活(U/g 质量)} = 0.536 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W \times 4 \text{ (稀释倍数)} = 9.66 \text{ U/g 质量。}$$

- 2、取 0.1g 大鼠肝脏组织加入 1.0 mL 试剂一，冰上充分研磨，10000rpm 4°C 离心 10min，取上清液稀释 8 倍后按测定步骤检测，用微量石英比色皿测得 ΔA 测定管=A 测 1-A 测 2=0.9916-0.5632=0.4284， ΔA 空白管=A 空 1-A 空 2=0，按样本质量计算酶活得：

$$\text{GR 酶活(U/g 质量)} = 0.536 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W \times 8 \text{ (稀释倍数)} = 18.37 \text{ U/g 质量。}$$

相关发表文献:

[1] Hua Li, Lanying Wang, Yanping Luo. Composition Analysis by UPLC-PDA-ESI (-)-HRMS and Antioxidant Activity Using *Saccharomyces cerevisiae* Model of Herbal Teas and Green Teas from Hainan. *Molecules*. October 2018;(IF3.06)

[2] Zeyong Zhang, Huanhuan Liu, Ce Sun, et al. A C2H2 zinc-finger protein OsZFP213 interacts with OsMAPK3 to enhance salt tolerance in rice. *Journal of Plant Physiology*. October 2018;(IF2.825)

[3] Li S, Tian Y, Wu K, et al. Modulating plant growth–metabolism coordination for sustainable agriculture[J]. Nature, 2018, 560(7720): 595-600.

参考文献:

[1] Demiral T, Türkan I. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance[J]. Environmental and experimental botany, 2005, 53(3): 247-257.

相关系列产品:

- BC1150/ BC1155 硫氧还蛋白氧化还原酶 (TrxR) 活性检测试剂盒
- BC1210/ BC1215 γ -谷氨酰半胱氨酸连接酶 (GCL) 活性检测试剂盒
- BC1220/ BC1225 γ -谷氨酰转肽酶 (γ -GT) 活性检测试剂盒
- BC1170/ BC1175 还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量检测试剂盒