

谷胱甘肽还原酶(GR)测试盒说明书(精简版)

(A062-1-1 50管/48样)

免责声明：测试前请仔细阅读说明书，预试后再进行批量实验，否则由此导致的后果用户自行承担！

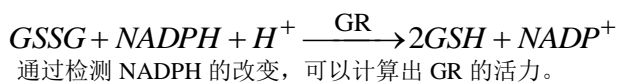
一、测定意义：

谷胱甘肽还原酶(Glutathione Reductase)是一种黄素酶，每分子酶蛋白含有一分子的 FAD。由辅酶 NADPH 供氢，催化氧化型谷胱甘肽 (GSSG)，还原成还原型谷胱甘肽 (GSH)。还原型谷胱甘肽 (GSH) 可使含巯基 (-SH) 的酶处于还原状态及活性状态，维持红细胞膜的完整性，防止血红蛋白氧化。

GR 定位于微粒体及细胞液部分。因各脏器的组织细胞普遍含有 GR，因而 GR 在机体的氧化还原反应中起了举足轻重的地位。

二、测定原理：

氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 在谷胱甘肽还原酶 GR 的催化下，由 NADPH 供氢，使 GSSG 还原生成还原型谷胱甘肽 (GSH) 后，GSH 增加，NADPH 减少。在 340nm 处可检测到 NADPH 的吸光度值的下降。



三、所需仪器耗材及试剂：

含 340nm 波长的紫外分光光度计及 1cm 光径石英比色皿、37℃ 水浴锅、台式低速离心机、各种规格移液器、双蒸水、生理盐水 (0.9%) 或 PBS (0.1M)、涡旋混匀器、试管或离心管、蛋白测定试剂 (组织及细胞样本用，本公司有售)。

四、试剂组成：(试剂盒有效期 6 个月)

试剂一： 60mL×2 瓶，4℃ 保存。

试剂二： 粉剂×4 支，4℃ 保存；用时每支加双蒸水 1mL 充分溶解后备用，4℃ 保存。

试剂三： 粉剂×2 支，4℃ 保存；用时每支加双蒸水 1mL 充分溶解后备用，-20℃ 以下保存。

工作液的配制： 按试剂一：试剂二：试剂三=2300：60：30 的比例进行配制，用多少配多少，现用现配，余下的 4℃ 保存 4~5 天 (使用前在 37℃ 预温 5 分钟)。

五、GR 活力的测定：

1、样本前处理：

血清(浆)等液体样本： 直接使用。

细胞培养液： 吸取部分 4000 转/分离心 5 分钟，取上清检测。

动物组织样本： 准确称取组织重量，按重量 (g)：体积 (mL)=1:9 的比例，加入 9 倍体积的生理盐水，冰水浴条件下机械匀浆，4000 转/分，离心 10 分钟，取上清液 (上清液需要测定其蛋白浓度，蛋白测定试剂盒本公司有售) 待测。

植物组织样本： **方法一**是先将植物组织用 PBS 擦洗干净，再用吸水纸吸干，后剪碎放入研钵中，液氮研磨成粉，称取植物粉末，按重量 (g)：体积 (mL)=1:9 的比例，加入 9 倍体积的 PBS，涡旋震荡 (或研磨仪研磨) 1 分钟，4000 转/分，离心 10 分钟，取上清液待测；**方法二**是在洗净并擦干水分后，直接称重，

按重量 (g)：体积 (mL)=1:9 的比例，加入 9 倍体积的 PBS，冰水浴条件下机械匀浆，4000 转/分，离心 10 分钟，取上清液待测。(注：一般水分含量较高的植物用方法二来处理，相反水分含量低或者干样推荐用方法一处理)

细胞样本： 收集细胞后，每份细胞 (细胞数量尽量不要低于 10⁶ 个，越多越好) 加入 0.3mL 的生理盐水 (或者 PBS)，冰水浴下超声破碎 (功率 200-300W，运行 5 秒，间隔 15 秒，反复 3-5 次)，4000 转/分离心 10 分钟，取上清液 (上清液需要测定其蛋白浓度，蛋白测定试剂盒本公司有售) 待测。

2、操作过程：

①、将紫外分光光度计于 340nm 处，1cm 光径石英比色皿，用双蒸水调零；(石英比色皿准备两只，一只用于调零，一只用于测定)。

②、往相应编号的试管中加入 50μL 样本，吸取工作液 2.4mL 冲入试管中，快速混匀，并计时；

③、迅速倒入石英比色皿中，紫外分光光度计，340nm 处比色，30 秒时读取吸光度值 A₁；

④、将此反应液倒入原试管中置 37℃ 水浴，2 分 20 秒时迅速再倒入石英比色皿中，2 分 30 秒时读取吸光度值 A₂；

⑤、求出 2 次吸光度差值 (ΔA=A₁-A₂)。

[注]：第一次读数时的时间可以不固定(20 秒、40 秒等都可以，但不要太长)，只要读 A₁ 和 A₂ 之间的时间差为 2 分钟即可；如果 A₁ 和 A₂ 值接近，可以增加样本体积，或者延长反应时间 (如 5min 或 10min)。

六、活力定义与计算：

①、血清(浆)等液体样本 (包括细胞培养液) 中 GR 的活力单位定义：每升液体样本每分钟使反应体系中底物 NADPH 的浓度改变 1mM 所需的酶量为一个酶活力单位 U。

计算公式：

$$\text{液体样本 GR 活力(U/L)} = \frac{\Delta A}{6.22 \times d} \div T \div V_{\text{样}} \times N$$

②、组织、细胞中 GR 活力单位的定义：样本中每克蛋白对应的酶量每分钟使反应体系中底物 NADPH 的浓度改变 1mM 所需的酶量为一个酶活力单位 U。

计算公式：

$$\text{组织、细胞中 GR 活力(U/gprot)} = \frac{\Delta A}{6.22 \times d} \div T \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr})$$

以上公式中：

6.22 为 NADPH 在 340nm 波长 1cm 光径的消光系数；

d：比色光径，1cm；

T：反应时间，2min；

V_样：取样量，0.05×10⁻³L；

N：样本测试前稀释倍数；

Cpr：组织匀浆蛋白浓度，gprot/mL (prot 指蛋白)。