谷胱甘肽还原酶（GR）活性测定试剂盒说明书

（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 mg×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 mg×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，了解本批样品和实验流程，避免样本和试剂浪费！

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 4ºC 或冰浴匀浆(或使用各类常见电动匀浆器)。4ºC 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 4ºC 或冰浴进行匀浆(或使用各类常见电动匀浆器)。4ºC 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 25ºC，设定波长到 412 nm。

② 所有试剂在使用前解冻在室温或 25℃水浴锅中温育 10min。

③ 试剂一和提取液和试剂三可按照 100:60:10 比例配成混合液（一枪加 170μL 该混合液）（**该混合液用多少配多少，现配现用**）；可先加样本，再加试剂二（该试剂务必单独加），最后加**现配现用的混合液**。

④ 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℃）条件下孵育10min后再读取A2；△A= A2 - A1。	

【注】：1、若△A 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△A 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、△A 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△A 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℃静置 5min；再加 5μL 试剂 B，混匀后于 25℃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。

GR 酶活(nmoL/min/mg prot)=(△A÷ε÷d÷2×10^9×V2)÷(Cpr×V1)÷T×D=73.5×△A÷Cpr×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。

GR 酶活(nmoL/min/g 鲜重)=(△A÷ε÷d÷2×10^9×V2)÷(W×V1÷V)÷T×D=73.5×△A÷W×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。

GR 酶活(nmoL/min/10^4 cell)=(△A÷ε÷d÷2×10^9×V2)÷(500×V1÷V)÷T=0.147×△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。

GR 酶活(nmoL/min/mL)=(△A÷ε÷d÷2×10^9×V2)÷V1÷T=73.5×△A

ε---TNB 摩尔消光系数，1.36×10^4 L/mol/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，20μL =2×10^{-2} mL； W---样本质量，g；
V2---反应体系总体积，200μL=2×10^{-4} 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;