

谷胱甘肽还原酶(GR)活性检测试剂盒说明书

Glutathion Reductases Assay Kit

紫外分光光度法

货号: AK092

规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK092-A	100mL×1 瓶	4℃保存;
AK092-B	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加入 5.0 mL 蒸馏水, 混匀;
AK092-C	3ml×1 瓶	4℃保存;

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 谷胱甘肽还原酶 (Glutathion Reductases, 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 催化 GSSG 还原生成 GSH, 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。

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。

自备用品:

紫外分光光度计、1ml 石英比色皿、水浴锅、低温离心机、可调式移液枪、研钵、冰和双蒸水。

粗酶液提取:

1. 细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10⁴ 个): AK092-A 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL AK092-A, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 300W, 超声 3s, 间隔 7s, 总时间 3min); 然后 8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
2. 组织: 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK092-A, 进行冰浴匀浆。8000g, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
3. 血清 (浆) 样品: 直接检测。

测定步骤:

1. 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
2. AK092-A 置于 25℃ (普通物质) 或者 37℃ (哺乳动物) 水浴中预热 30min。
3. 样本测定, 依次在 1mL 石英比色皿中加入下列试剂:

试剂名称	测定管 (ul)	空白管 (ul)
AK092-A		850
AK092-B		100
AK092-C		50
充分混匀后于 340nm 处测定 10 s 和 190 s 吸光度, 分别记为 A 空 1 和 A 空 2, ΔA 空白管 = A 空 1 - A 空 2;		
AK092-A	750	
AK092-B	100	

待测样本(上清液)	100	
AK092-C	50	
充分混匀后于 340nm 处测定第 10 s 和第 190s 的吸光值, 分别记为 A 测 1 和 A 测 2, ΔA 测定管 = A 测 1 - A 测 2。		

注意: 空白管只需测定 1-2 次。

GR 酶活性计算:

1. 按蛋白浓度计算

活性单位定义: 一定温度中, pH8.0 条件下, 每 mg 蛋白每分钟催化 1 μ mol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{计算公式: GR (U/mg prot)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T \\ = 0.536 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

2. 按样本质量计算

活力单位定义: 一定温度中, pH8.0 条件下, 每 g 样本每分钟催化 1 μ mol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{计算公式: GR (U/g)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 0.536 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

3. 按细胞数量计算

活性单位定义: 一定温度中, pH8.0 条件下, 每 10⁴ 个细胞每分钟催化 1 μ mol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{计算公式: GR (U/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 0.536 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量}$$

4. 按液体体积计算

活性单位定义: 一定温度中, pH8.0 条件下, 每毫升液体每分钟催化 1 μ mol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{计算公式: GR (U/mL)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div V \text{ 样} \div T \\ = 0.536 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管})$$

注: ϵ : NADPH 摩尔消光系数 6.22 $\times 10^3$ L/mol/cm; V 反总: 反应体系总体积, 1000 μ L=0.001 L; 10⁶: 1mol=1 $\times 10^6$ μ mol; Cpr: 上清液蛋白浓度 (mg/mL); V 样: 加入反应体系中上清液体积, 100 μ L=0.1 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; W, 样本质量(g); T: 反应时间, 3min。

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. AK092-B 须临用前配制, 配制完后, 置于冰上, 未使用完的 4 $^{\circ}$ C 保存, 三天内使用完;
3. 测定前须先用 1~2 个样做预实验, 确保 180s 内吸光值变化呈线性, 哺乳动物组织一般须用 AK092-A 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 AK092-A 后研磨或超声波处理, 不能用细胞裂解液处理细胞;
5. AK092-A 中含有一定浓度的蛋白 (约 0.1 mg/mL), 测定样品蛋白浓度时需减去本身的蛋白含量。