

谷胱甘肽还原酶（GR）活性测定试剂盒说明书

（货号：G0209W 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。另外，改进样本前处理，加相应试剂先消除样本本身的GSH含量，以确保检测结果的精确度。

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°C保存	
试剂 A	液体 0.6mL×1 支	4°C保存	用前甩几下或 4°C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°C保存	用前甩几下或 4°C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°C保存	用前甩几下或 4°C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°C保存	用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部，再加 1.1mL 蒸馏水溶解；溶解后-20°C保存 2 周。
试剂三	液体 1.5mL×1 支	4°C保存	固体出现可以 25°C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，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备

（1）组织样本：

- ① 称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。4°C×12000rpm 离心 20min。
- ② 取出 200μL 上清液转移到新的 EP 管中，加入 5μL 试剂 A（留意观察，有气泡产生），25°C静置 5min；
- ③ 再加入 5μL 试剂 B（观察，会出现气泡或无气泡等现象，均属正常现象，均不影响后续实验），25°C静置 5min。作为上机检测的样本粗提液。

【注】：①根据实验室条件，可先液氮研磨，再加提取液，进行冰浴匀浆

②根据研究需求，可按组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：10 的比例进行提取。

（2）细菌/细胞样本：

- ① 先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL

提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃离心 10min，取上清备用。

② 取出 100μL 上清液转移到新的 EP 管中，加入 5μL 试剂 A（留意观察，有气泡产生），25℃静置 5min；

③ 再加入 5μL 试剂 B（观察，会出现气泡或无气泡等现象，均属正常现象，均不影响后续实验），25℃静置 5min。作为上机检测的样本粗提液。

【注】：①根据实验室条件，可先液氮研磨，再加提取液，进行冰浴匀浆

②若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

（3）液体样本：

取 100μL 液体转移到新的 EP 管中，加入 5μL 试剂 A，25℃静置 5min；再加入 5μL 试剂 B，25℃静置 5min。作为上机检测的样本粗提液。

2、上机检测

① 酶标仪预热 30 min，设置温度在 25℃，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。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； $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】：1、若 ΔA 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 ΔA 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、 ΔA 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、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)=($\Delta A \div \epsilon \div d \div 2 \times 10^9 \times V2$) \div (Cpr \times V1) \div T \times D=73.5 \times $\Delta A \div$ Cpr \times 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)=($\Delta A \div \epsilon \div d \div 2 \times 10^9 \times V2$) \div (W \times V1 \div V) \div T \times D=73.5 \times $\Delta A \div$ W \times D

3、按细胞/细菌数量计算：

酶活定义：每 10⁴ 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/10⁴ cell)=($\Delta A \div \epsilon \div d \div 2 \times 10^9 \times V2$) \div (500 \times V1 \div V) \div T=0.147 \times ΔA

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)=($\Delta A \div \epsilon \div d \div 2 \times 10^9 \times V2$) \div V1 \div T=73.5 \times ΔA

ϵ ---TNB 摩尔消光系数，1.36 \times 10⁴ 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 \times 10⁻² mL； W---样本质量，g；

V2---反应体系总体积，200μL=2 \times 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；