

谷胱甘肽还原酶(GR)测试盒

(货号: BC098 紫外比色法 50 管/48 样)

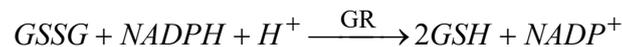
一、测定意义:

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。



通过检测 NADPH 的改变, 可以计算出 GR 的活力。

三、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)。

四、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 50 μ L 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 A_1 ；
- ④、将此反应液倒入原试管中置 37 $^{\circ}$ C 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 A_2 ；
- ⑤、求出 2 次吸光度差值 ($\Delta A = A_1 - A_2$)。

[注]：第一次读数时的时间可以不固定(20 秒、40 秒等都可以，但不要过长)，只要读 A_1 和 A_2 之间的时间差为 2 分钟即可；如果 A_1 和 A_2 值接近，可以增加样本体积，或者延长反应时间（如 5min 或 10min）。

五、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；
- $V_{\text{样}}$: 取样量， 0.05×10^{-3} L；
- 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）。

六、举例：

例 1：往试管中加入大鼠血浆 50 μ L，再加入工作液 2.4mL，混匀后倒入 1cm 光径的石英比色皿中，340nm 处比色，测得 30 秒时的 A_1 值为 0.441。37 $^{\circ}$ C 准确反应 2 分钟。迅速取出比色皿擦干比色，测得 2 分 30 秒时的 A_2 值为 0.431。则计算结果如下：

$$\begin{aligned} \text{大鼠血浆 GR 活力(U/L)} &= \frac{0.441 - 0.431}{6.22 \times 1} \div 2 \div (0.05 \times 10^{-3}) \\ &= 16.08 \text{U/L} \end{aligned}$$

例 2：往试管中加入 4% 小鼠肝组织匀浆 50 μ L，再加入工作液 2.4mL，混匀后倒入预温的 1cm 光径的石英比色皿中，340nm 处比色，测得 30 秒时的 A_1 值为 0.504。37 $^{\circ}$ C 水浴，准确反应 2 分钟。迅速取出比色皿比色，测得 2 分 30 秒时的 A_2 值为 0.491。同时测得 4% 肝组织匀浆的蛋白浓度为 2.96×10^{-3} gprot/mL。则计算结果如下：

$$\begin{aligned} \text{组织中 GR 活力 (U/gprot)} &= \frac{0.504 - 0.491}{6.22 \times 1} \div 2 \div (0.05 \times 2.96 \times 10^{-3}) \\ &= 7.06 \text{U/gprot} \end{aligned}$$