

谷胱甘肽还原酶 (glutathione reductase, GR) 说明书

分光光度法 50 管/48 样

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

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，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。

测定原理：

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。

自备仪器和用品：

紫外分光光度计、低温离心机、水浴锅、移液器、1mL 石英比色皿和蒸馏水

试剂组成和配置：

试剂一：液体 100mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：粉剂×2 瓶，-20℃保存。临用前加入 3 mL 蒸馏水，混匀。

试剂三：粉剂×2 支，-20℃保存。临用前加入 1.5 mL 蒸馏水，混匀。

粗酶液提取：

1. 组织：按照组织质量 (g)：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）进行冰浴匀浆。8000g，4℃离心 15min，取上清，置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量 (10⁴ 个)：提取液体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 8000g，4℃，离心 15min，取上清置于冰上待测。
3. 血清等液体：直接测定。

操作步骤：

1. 分光光度计预热 30 min，调节波长到 340 nm，蒸馏水调零。
2. 试剂一置于 25℃（普通物质）或者 37℃（哺乳动物）中预热 30min。
3. 测定管：取 1mL 石英比色皿，依次加入 50μL 试剂三，100μL 试剂二，750μL 试剂一，100μL 上清液，混匀，于 340nm 迅速测定初始吸光度和 180 s 吸光度，记为 A 测 1 和 A 测 2， ΔA 测定管 = A 测 1 - A 测 2。（注意加完上清液后迅速混匀测定）

计算公式：

(1). 按蛋白浓度计算

活性单位定义：在一定温度中，pH8.0 条件下，每毫克蛋白每分钟催化 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{GR 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \text{ 测定管} \div \epsilon \div d \times V \text{ 反应} \times 10^9] \div [\text{Cpr} \times V \text{ 样}] \div T \\ = 536 \times \Delta A \text{ 测定管} \div \text{Cpr}$$

(2). 按样本质量计算

活性单位定义：在一定温度中，pH8.0 条件下，每克样本每分钟催化 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{GR 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \text{ 测定管} \div \epsilon \div d \times V \text{ 反应} \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$

$$= 536 \times \Delta A \text{ 测定管} \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：在一定温度中，pH8.0 条件下，每 10^4 个细胞每分钟催化 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{GR 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [\Delta A \text{ 测定管} \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 536 \times \Delta A \text{ 测定管} \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：在一定温度中，pH8.0 条件下，每毫升液体每分钟催化 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{GR 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) &= [\Delta A \text{ 测定管} \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T \\ &= 536 \times \Delta A \text{ 测定管} \end{aligned}$$

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

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) 试剂二和试剂三须现配现用，配制完后，置于冰上，未使用完的 4°C 保存，三天内使用完。
- (3) 测定前须先用 1~2 个样做预实验，哺乳动物组织一般须用试剂一稀释 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 的提取时可加试剂一后研磨或超声波处理，不能用细胞裂解液处理细胞。