谷胱甘肽还原酶（GR）活性检测试剂盒说明书

规格：48 样　　方法：酶标仪法

一、注意事项

1. 使用前请通读一遍说明书再开始实验。
2. 正式检测前选取 2~3 个样本进行预检测。
3. 本试剂盒仅用于科研。
4. 加完上清液后必须迅速混匀测定，保证准确测出初始反应速度；
5. 当出现初始 180 s 内吸光值不稳定时，可以适当延长反应时间，选取相对稳定的时间段内吸光值变化值；
6. 当所测ΔA 测定管的值在零点附近徘徊时，可能原因：（1）样本谷胱甘肽还原酶活性低，建议浓缩样本后再进行测定；（2）样本谷胱甘肽还原酶活性过高，吸光值变化区间过小无法准确测出，建议样本稀释 2~5 倍后再进行测定）
7. 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；
8. 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℃保存，三天内使用完。

二、产品组分

试剂名称	试剂规格	保存条件	备注
试剂一	64 mL×1	4℃	
试剂二	粉剂×1	-20℃	临用前加入 1.2mL 蒸馏水，混匀。
试剂三	粉剂×1	-20℃	临用前加入 0.6mL 蒸馏水，混匀。

三、仪器和用品

酶标仪、96 孔板、移液器、天平、可降温离心机、超纯水/蒸馏水、研磨仪/研钵、冰、水浴锅。

四、样品制备

1. 组织：按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1 g 组织，加入 1 mL 试剂一）进行冰浴匀浆，然后，8000 g，4℃，离心 15 min，置于冰上，上清为待测样本。
2. 细菌/细胞：按照细菌/细胞数量（10^4 个）：试剂一体积（mL）为 500~1000：

1 的比例（建议 500 万细胞加入 1 mL 试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率 300 w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3 min）；然后 8000 g，4℃，离心 15 min，置于冰上，上清为待测样本。

3. 液体样本：澄清的液体的样本直接测定，若浑浊则离心后取上清液检测。

五、测定步骤

1. 酶标仪预热 30 min 以上，波长调至 340 nm 处。

2. 试剂一置于 25℃（其他物种）或者 37℃（哺乳动物）中预热 30 min。

2. 在 96 孔板中依次加入：

	测定管
试剂三（μL）	10
试剂二（μL）	20
试剂一（μL）	150
样本（μL）	20
充分混匀后，于 340 nm 迅速测定初始吸光度和 180 s 吸光度，记为 A1 和 A2，ΔA=A1 - A2。	

六、计算

1. 按照液体样本体积计算：

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 1 nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

谷胱甘肽还原酶（GR）活性（nmol/min/mL）=[ΔA÷ε÷d×V 反总×10^9]÷×V 样÷T=893.18×ΔA

2. 按照样本质量计算：

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

谷胱甘肽还原酶（GR）活性（nmol/min/g 鲜重）=[ΔA÷ε÷d×V 反总×10^9]÷（W×V 样÷V 样总）÷T=893.18×ΔA÷W

3. 按照蛋白质浓度计算（需另测蛋白浓度）：

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 1 nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

谷胱甘肽还原酶（GR）活性（nmol/min/mg prot）=[ΔA÷ε÷d×V 反总×10^9]÷[Cpr×V 样]÷T=893.18×ΔA÷Cpr

4. 按细菌/细胞数量计算：

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 1 nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

谷胱甘肽还原酶（GR）活性（nmol/min/10^4 cell）=[ΔA÷ε÷d×V 反总×10^9]÷（N×V 样÷V 样总）÷T=893.18×ΔA÷N

ε：NADPH 摩尔消光系数 6.22×10^3 L/mol/cm；d：96 孔板光径，0.6 cm；V 反总：反应体系总体积，200 μL=2×10^{-4} L；10^6：1 mol=1×10^6 μmol；Cpr：上清液蛋白浓度（mg/mL）；W：样品质量；V 样：加入反应体系中上清液体积，20 μL=0.02 mL；V 样总：提取液体积，1 mL；T：反应时间，3 min；N：细胞数量，万个。

七、产品简介

谷胱甘肽还原酶是植物和微生物体内催化氧化型谷胱甘肽（GSSG）还原为还原型谷胱甘肽（GSH）的关键氧化还原酶。主要功能是依赖 NADPH 催化 GSSG 的二硫键还原断裂生成两分子 GSH，在维持细胞氧化还原稳态、保护蛋白质巯基免受氧化损伤、抗氧化系统运行及重金属解毒过程中发挥核心作用，同时参与调控细胞周期、信号传导及逆境胁迫下的适应反应，是评价植物抗氧化防御效率、氧化还原平衡状态及胁迫耐受性的关键酶学指标。