

谷胱甘肽还原酶活性系数(GRAC)检测试剂盒

中文名称：谷胱甘肽还原酶活性系数(GRAC)检测试剂盒

英文名称：Glutathione Reductase Activation Coefficient Assay Kit

产品包装：盒装

产品规格：50T/24S

储存条件：-20°C

检测方法：可见分光光度法

有效期：6个月

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 40 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	粉剂×1 支	2-8°C保存
试剂三 A	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂三 B	液体 1mL×1 支	2-8°C保存
试剂四	液体 1.2mL×1 支	2-8°C保存
试剂五	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂六	液体 20 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂七	液体 50 mL×1 瓶	2-8°C保存

溶液的配制：

1. 试剂二：临用前加入 1.2mL 蒸馏水，充分溶解，2-8°C可保存 4 周；
2. 试剂三：临用前取试剂三 A 加入 0.537mL 试剂三 B，充分溶解，-20°C可分装保存 4 周，

避免反复冻融；

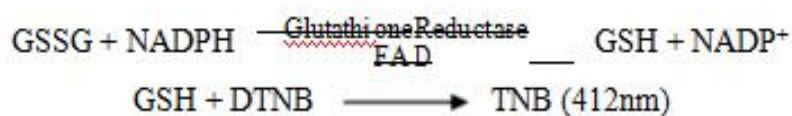
3. 工作液：临用前根据样本量按照试剂一：试剂二：试剂三：试剂四=80μL：20μL：8μL：

20μL(128μL, 1T)的比例配制工作液，现用现配；

4. 试剂五：临用前加入 1.2mL 蒸馏水，充分溶解，-20℃可分装保存 4 周，避免反复冻融；
5. 试剂五工作液：临用前根据样本量按照试剂五：蒸馏水=5μL：95μL(0.1mL, 5T)的比例配制，现用现配。

产品说明：

谷胱甘肽还原酶(Glutathione Reductase, GR)是广泛存在于真核与原核生物中的一种黄素蛋白氧化还原酶，该酶以核黄素衍生物核黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)为辅基，催化 NADPH 还原氧化型谷胱甘肽(GSSG)生成还原型谷胱甘肽(GSH)，维持巯基和膜蛋白处于还原状态。当生物体内缺乏核黄素时，FAD 含量相应减少，GR 活性也随之降低，谷胱甘肽还原酶活性系数(GR Activation Coefficient, GRAC)迅速升高，出现唇炎、口角炎、结膜炎等临床症状。因此，GRAC 用于核黄素营养状况评价，对于早期发现缺乏病患者采取防治措施具有重要意义。GR 催化 NADPH 还原 GSSG，生成 GSH，GSH 与 5, 5' -二硫代-双-(2-硝基苯甲酸)(5, 5' -dithiobis-2-nitrobenoic acid, DTNB)反应产生 2-硝基-5-巯基苯甲酸，2-硝基-5-巯基苯甲酸在波长 412nm 处有特征吸收峰，通过 412nm 处吸光度的变化可计算 GR 的活性。根据加入 FAD 前后 GR 活性的变化可计算得到 GRAC。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、低温离心机、分析天平、水浴锅/恒温培养箱、1mL 玻璃比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理(可适当调整待测样本量)

1. 组织样本: 按质量(g): 试剂一体积(mL)=1: 5~10 比例加入试剂一(建议称取 0.1g 样本, 加入 1.0mL 试剂一), 冰浴匀浆后, 于 4°C,12000rpm 离心 10min, 弃沉淀, 取上清液置于冰上待测。
2. 细胞样本: 按细胞数量(10^4): 试剂一体积(mL)=500~1000: 1 的比例加入试剂一(建议 500 万细胞加入 1.0mL 试剂一), 冰浴超声破碎细胞(功率 200W, 超声 3s, 间隔 7s, 总时间 3min), 然后于 4°C,12000rpm 离心 10min, 弃沉淀, 取上清液置于冰上待测。
3. 全血/红细胞: 建议取 10 μ L 全血/红细胞, 加入 990 μ L 试剂一, 充分溶血混匀, 于 4°C,4000rpm 离心 10min, 弃沉淀, 取上清液置于冰上待测。
4. 血清/血浆等液体样本: 直接测定。若有浑浊请离心后取上清置于冰上待测。

二、测定步骤

1. 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 412nm, 蒸馏水调零。
2. 将工作液 37°C 预热 10min。
3. 操作表: (在 1.5mLEP 管中加入下列试剂)

试剂名称(μ L)	测定管	对照管	标准管	空白管
样本	40	40	-	-
蒸馏水	-	-	40	-
工作液	-	-	-	40
试剂五工作液	40	-	40	40
混匀, 37°C 孵育 30min				
试剂六	320	320	320	320
混匀, 4000rpm 离心 10min, 取上清液于 EP 管中待测				
上清液	240	240	240	240
试剂七	800	800	800	800
混匀, 室温静置 5min, 取 1mL 反应液于 1mL 玻璃比色皿中, 测定 412 处的吸光值, 分别记为 A 测定、A 对照、A 空白。每个测定管需设置一个对照管, 空白管只需测定 1-2 次。				

三、GRAC 活性计算

$$\text{GRAC} = (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 对照} - \text{A 空白})$$

注意事项:

1. 建议准备核黄素水平正常的样本进行检测，方便与核黄素缺乏的样本进行比较；如果没有核黄素水平正常的样本，可参考一般核黄素水平正常的样本 GRAC 为 0.9-1.2；
2. 如果样本测定管吸光值大于 1.5，建议将样本用试剂一稀释后进行测定；如果样本测定管吸光值接近空白管，可适当增大样本质量重新提取或提高加样表中样本体积，对照管、空白管蒸馏水需进行相应调整。
3. 样本蛋白浓度需自行测定。由于提取液中含有一定浓度的蛋白(约 0.11mg/mL)，所以在测定样本蛋白浓度时需要减去提取液本身的蛋白含量。

实验实例：

1. 取 0.1051g 大鼠肾脏样本，加入 1mL 试剂一进行冰浴匀浆，离心后取上清，按照测定步骤操作，用 1mL 玻璃比色皿测得：A 测定=0.482，A 对照=0.465，A 空白=0.084，计算得：GRAC=(A 测定-A 空白)÷(A 对照-A 空白)=1.045。
2. 取 10 μ L 人红细胞，加入 990 μ L 试剂一，充分溶血混匀，离心后取上清，按照测定步骤操作，用 1mL 玻璃比色皿测得：A 测定=0.530，A 对照=0.529，A 空白=0.084，计算得：GRAC=(A 测定-A 空白)÷(A 对照-A 空白)=1.002。
3. 取马血清样本，直接按照测定步骤操作，用 1mL 玻璃比色皿测得：A 测定=0.453，A 对照=0.451，A 空白=0.084，计算得：GRAC=(A 测定-A 空白)÷(A 对照-A 空白)=1.005。