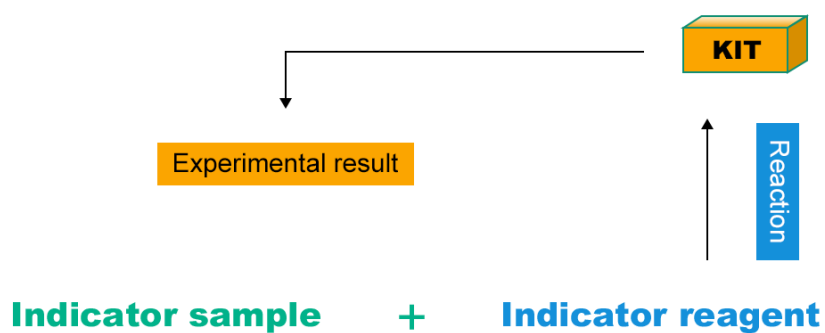


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0328

Size: 100T/96S

谷胱甘肽还原酶 (GR) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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, GR 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。

二、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 340nm 有特征吸收峰, 相反 NADP^+ 在该波长无吸收峰; 通过测定 340nm 吸光度下降速率来测定 NADPH 脱氢速率, 从而计算 GR 活性。

三、需自备的仪器和用品:

低温离心机、水浴锅、移液器、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板 (ZC-1036: UV 板) 和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 120mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂二	液体 1mL × 1 支	4°C 保存	
试剂三	粉剂 × 1 瓶	4°C 保存	临用前加入 2.0mL 蒸馏水, 混匀

五、操作步骤：

● 粗酶液提取：

称约 0.1g 组织，加入 1.0 mL 试剂一，冰上充分研磨，10000rpm 4℃离心 10min，取上清液，待测。

● GR 测定操作：

1. 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长到 340nm，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 以上。

3. **空白管：**取微量石英比色皿或 96 孔板（UV 板），加入 10 μL 试剂二，20 μL 试剂三，170 μL 试剂一，于 340nm 测定 10s 和 190s 吸光度，记为 A 空 1 和 A 空 2。

4. **测定管：**取微量石英比色皿或 96 孔板（UV 板），加入 10 μL 试剂二，20 μL 试剂三，20 μL 上清液，150 μL 试剂一，于 340nm 测定 10s 和 190s 吸光度，记为 A 测 1 和 A 测 2。

注：样品测定 10s 时吸光度后，将比色皿放入 25℃（普通物质）或者 37℃（哺乳动物）水浴，3min 后拿出，吸打混匀，立即测定 190s 时的吸光度。

六、GR 活性计算：

● 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

（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 1 μmol NADPH 氧化为一个酶活力单位。

$$\text{GR 酶活 (U/mg prot)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反应} \times 10^6] \div (C_{\text{pr}} \times V \text{ 样}) \div T = 0.536 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

活性单位定义：在一定温度中，pH8.0 条件下，每克样品每分钟催化 $1 \mu\text{mol}$ NADPH 氧化为一个酶活力单位。

$$\text{GR 酶活 (U/g 鲜重)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T = 0.536 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

ΔA 空白管 = A 空 1 - A 空 2, ΔA 测定管 = A 测 1 - A 测 2; ϵ : NADPH 摩尔消光系数 $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1cm ; V 反总: 反应体系总体积, $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$; 10^6 : $1 \text{ mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; C_{pr} : 上清液蛋白浓度 (mg/mL) W : 样品质量; V 样: 加入反应体系中上清液体积, $20 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-2} \text{ mL}$; V 样总: 提取液体积, 1mL ; V 样总: 提取液体积, 1mL ; T : 反应时间, 3min 。

● 使用 96 孔板 (UV 板) 测定的计算公式如下

(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 $1 \mu\text{mol}$ NADPH 氧化。

$$\text{GR 酶活 (U/mg prot)} = [(\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (C_{pr} \times V \text{ 样}) \div T = 0.893 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div C_{pr}$$

(2) 按样本鲜重计算

活性单位定义：在一定温度中，pH8.0 条件下，每克样品每分钟催化 $1 \mu\text{mol}$ NADPH 氧化。

$$\text{GR 酶活 (U/g 鲜重)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T = 0.893 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

ΔA 空白管 = A 空 1 - A 空 2, ΔA 测定管 = A 测 1 - A 测 2; ϵ : NADPH 摩尔消光系数 $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 96 孔板 (UV 板) 光径, 0.6cm ; V 反总: 反应体系总体积, $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$; 10^6 : $1\text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; C_{pr} : 上清液蛋白浓度 (mg/mL) W : 样品质量; V 样: 加入反应体系中上清液体积, $20 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-2} \text{ mL}$; V 样总: 提取液体积, 1mL ; V 样总: 提取液

积, 1mL; T: 反应时间, 3 min。

七、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) 试剂三须现配现用, 配置完后, 置于冰上;
- (3) 测定前须先用 1~2 个样做预实验, 确保 180s 内吸光值变化呈线性, 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。