

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-S0599

Size: 50T/48S

谷胱甘肽还原酶 (GR) 检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

*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, 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, 同时不断消耗 NADPH 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:

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。

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×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加入 5.0 mL 蒸馏水, 混匀
试剂三	液体×1 支	4℃保存	

五、操作步骤:

● 粗酶液提取

1. 组织：按照组织质量 (g) : 试剂一体积 (ml) 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。10000rpm, 4℃离心 10min, 取上清置冰上待测。

2. 细菌、真菌：按照细胞数量 (10^4 个) : 试剂一体积 (ml) 为 500-1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1ml 试剂一), 冰浴超声破碎细胞 (功率 300w, 超声 3s, 间隔 7s, 总时间 3min); 然后 10000rpm, 4℃, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。

● GR 测定操作:

(1) 分光光计预热 30 min 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 1mL 石英比色皿, 加入 850μL 试剂一, 100μL 试剂二, 50μL 试剂三, 充分混匀, 于 340nm 处测定 10 s 和 190 s 吸光度, 记为 A 空1 和 A 空 2, ΔA 空白管 = A 空1 - A 空2。

(4) 测定管: 取 1mL 石英比色皿, 加入 750μL 试剂一, 100μL 试剂二, 100μL 上清液, 50μL 试剂三, 充分混匀, 于 340nm 处测定 10s 和 190 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: 空白管只需要测定一次。

六、GR 活性计算:

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 1μmol NADPH 氧化。

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

1. 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 1μmol NADPH 氧化。

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

2. 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 $1\mu\text{mol}$ NADPH 氧化。

GR 酶活 (U/ 10^4 cell) = $[(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.536 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量}$

ϵ : NADPH 摩尔消光系数 $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; $V \text{ 反总}$: 反应体系总体, $1000\mu\text{L} = 0.001 \text{ L}$; 10^6 : $1 \text{ mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; C_{pr} : 上清液蛋白浓度 (mg/mL); $V \text{ 样}$: 加入反应体系中上清液体积, $100\mu\text{L} = 0.1 \text{ mL}$; $V \text{ 样总}$: 加入提取液体积 1 mL ; W , 样本质量, g; 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. 试剂二须现配现用，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。