

上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

## 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

#### 产品内容：

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	-

#### 产品说明：

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。

GR 能催化 NADPH 还原 GSSG 再生 GSH，同时不断消耗 NADPH 生成 NADP<sup>+</sup>；NADPH 在 340nm 有特征吸收峰，相反 NADP<sup>+</sup> 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。

#### 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。

#### 操作步骤：

##### 一、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<sup>4</sup> 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。

##### 二、GR 测定操作：

(1) 分光光计预热 30 min 以上，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 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， $\Delta A$  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 10 s 和 190 s 吸光度，记为 A 测 1 和 A 测 2， $\Delta A$  测定管 = A 测 1 - A 测 2。

**注意：空白管只需要测定一次。**

### 三、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  $1\mu\text{mol}$  NADPH 氧化。

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

$$= 0.536 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

#### 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  $1\mu\text{mol}$  NADPH 氧化。

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

$$= 0.536 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

#### 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。

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

$\epsilon$  : NADPH 摩尔消光系数  $6.22 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$ ;  $V$  反总: 反应体系总体,  $1000\mu\text{L} = 0.001 \text{L}$ ;  $10^6$ :  $1 \text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$ ;  $\text{Cpr}$ : 上清液蛋白浓度 ( $\text{mg/mL}$ );  $V$  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  $1\text{mL}$ ;  $W$ , 样本质量,  $\text{g}$ ;  $T$ : 反应时间,  $3 \text{min}$ 。

### 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；
3. 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。