

谷胱甘肽还原酶（GR）活性测定试剂盒（微量法）

注意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

产品货号：BA1118

产品规格：100管/96样

产品简介：

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⁺；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。

产品内容：

试剂一：液体120mL×1瓶，4℃保存。

试剂二：粉剂1mL×1瓶，4℃保存。

试剂三：液体×1支，4℃保存。临用前加入2.0 mL蒸馏水，混匀。

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（UV板）和蒸馏水。

操作步骤：

一、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。

二、GR 测定操作：

1、分光光度计/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，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 2。

4、测定管：取微量石英比色皿或96孔板，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。

三：GPX活性计算：

a.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1μmol NADPH氧化为一个酶活力单位。

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

(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氧化为一个酶活力单位。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

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

$\Delta A_{\text{空白管}} = A_{\text{空1}} - A_{\text{空2}}$, $\Delta A_{\text{测定管}} = A_{\text{测1}} - A_{\text{测2}}$; ϵ : NADPH摩尔消光系数 $6.22 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1 cm; $V_{\text{反应总}}$: 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; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积, $20 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-2} \text{mL}$; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1mL; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1mL; T : 反应时间, 3min。

b.使用96孔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。

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

(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。

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

$\Delta A_{\text{空白管}} = A_{\text{空1}} - A_{\text{空2}}$, $\Delta A_{\text{测定管}} = A_{\text{测1}} - A_{\text{测2}}$; ϵ : NADPH摩尔消光系数 $6.22 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$; d : 96孔板光径, 0.6cm; $V_{\text{反应总}}$: 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; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积, $20 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-2} \text{mL}$; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1mL; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1mL; T : 反应时间, 3min

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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com