

## 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<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。

### 产品内容：

试剂一：液体120mL×1瓶，4℃保存。

试剂二：液体1mL×1瓶，4℃保存。

试剂三：粉剂×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10μL试剂二，20μL试剂三，170μL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10μL试剂二，20μL试剂三，20μL上清液，150μL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



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

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 $\mu$ mol NADPH氧化为一个酶活力单位。

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

$\Delta A_{\text{空白管}} = A_{\text{空1}} - A_{\text{空2}}$ ， $\Delta A_{\text{测定管}} = A_{\text{测1}} - A_{\text{测2}}$ ； $\epsilon$ ：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， $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ； $10^6$ ： $1 \text{ mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$ ； $C_{\text{pr}}$ ：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，1 mL； $V_{\text{样总}}$ ：提取液体积，1 mL； $T$ ：反应时间，3 min。

#### 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 $\mu$ mol NADPH氧化。

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

##### (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 $\mu$ mol NADPH氧化。

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

$\Delta A_{\text{空白管}} = A_{\text{空1}} - A_{\text{空2}}$ ， $\Delta A_{\text{测定管}} = A_{\text{测1}} - A_{\text{测2}}$ ； $\epsilon$ ：NADPH摩尔消光系数 $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； $d$ ：96孔板光径，0.6 cm； $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ； $10^6$ ： $1 \text{ mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$ ； $C_{\text{pr}}$ ：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，1 mL； $V_{\text{样总}}$ ：提取液体积，1 mL； $T$ ：反应时间，3 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