

## 谷胱甘肽还原酶 (GR) 检测试剂盒

### 紫外分光光度法

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

货号：BC1160

规格：50T/48S

#### 产品内容：

试剂一：液体100mL×1瓶，4℃保存。

试剂二：液体3mL×1瓶，4℃保存。

试剂三：粉剂×1瓶，4℃保存。临用前加入5.0 mL蒸馏水，混匀。

#### 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，GR催化GSSG还原生成GSH，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NADPH脱氢生成NADP<sup>+</sup>；NADPH在340 nm有特征吸收峰，相反NADP<sup>+</sup>在该波长无吸收峰；通过测定340 nm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-可见分光光度计、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：

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. 紫外-可见分光光度计预热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50μL试剂二，100μL试剂三，850μL试剂一，于340nm测定10 s和190 s吸光度，记为A空1和A空2。
4. 测定管：取1mL石英比色皿，加入50μL试剂二，100μL试剂三，100μL上清液，750μL试剂一，于340nm测定10 s和190 s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、GR活性计算：

###### （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。

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

###### （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 $\mu$ mol NADPH氧化为一个酶活力单位。

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

$\Delta A_{\text{空白管}} = A_{\text{空1}} - A_{\text{空2}}$ ； $\Delta A_{\text{测定管}} = A_{\text{测1}} - A_{\text{测2}}$ ； $\epsilon$ ：NADPH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； $d$ ：比色皿光径，1cm； $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， $1000 \mu\text{L} = 0.001 \text{ L}$ ； $10^6$ ：单位换算系数， $1 \text{ mol} = 10^6 \mu\text{mol}$ ； $C_{\text{pr}}$ ：上清液蛋白浓度，mg/mL； $V_{\text{样}}$ ：加入反应体系中上清液体积， $100 \mu\text{L} = 0.1 \text{ mL}$ ； $T$ ：反应时间，3 min； $W$ ：样本鲜重，g。

#### 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，哺乳动物组织一般须用试剂一稀释2~5倍；
- (4) 由于试剂一中含有一定浓度的蛋白(约0.1mg/mL)，所以在测定样本蛋白浓度时需要减去试剂一本身的蛋白含量。