



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

谷胱甘肽还原酶(GR)活性检测试剂盒-可见显色法 分光法

产品编号	产品名称	包装
R32726-48T	谷胱甘肽还原酶(GR)活性检测试剂盒-可见显色法 分光法	48T

产品简介:

谷胱甘肽还原酶 (GR, EC 1.6.4.2) 是在动植物中都有发现, 是一类黄素蛋白氧化还原酶, 催化氧化型谷胱甘肽(GSSG) 还原成还原型谷胱甘肽 (GSH), GSH / GSSG 的比率越高, 则越能清除氧化胁迫过程中产生的活性氧, 因此 GR 酶活性高低是衡量氧化应激能力的一个重要指标。

GR 催化 GSSG 生成的 GSH 可以与 DTNB 反应, 生成黄色产物 (TNB)。该产物在 412nm 处有最大吸收。TNB 生成量和 GR 活性成线性正相关, 可通过测定 412nm 处吸光值计算出谷胱甘肽还原酶 (GR) 的活性水平。该方法在可见光下测定, 检测产物相对传统测试方法灵敏度高、测定物更稳定、可操作性更强。

产品组成:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 80mL × 1 瓶	4℃ 保存	
试剂 A	液体 0.25 mL × 1 支	4℃ 保存	用前甩几下或 4℃ 离心使试剂落入试管底部, 避免试剂浪费。
试剂 B	粉末 × 1 支	-20℃ 保存	用前甩几下或 4℃ 离心使试剂落入管底部, 再加 0.3 mL 蒸馏水溶解用, 现配现用。
试剂一	粉末 × 1 瓶	4℃ 保存	用前甩几下或 4℃ 离心使试剂落入试管底部, 再加 25mL 蒸馏水溶解。
试剂二	粉末 × 2 支	4℃ 保存	用前甩几下或 4℃ 离心使试剂落入试管底部, 每管加入 1.1ml 蒸馏水溶解; 溶解后 -20℃ 保存 2 周。
试剂三	液体 2.5mL × 1 瓶	4℃ 保存	固体出现可以 25℃ 水浴 5min, 使其呈液体状态。



使用方法:

建议正式实验前, 选取 2 个样本做预测定, 了解实验样品情况, 熟悉流程, 避免样本和试剂浪费。

一、样本准备:

1. 组织样本:

- (a) 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆;
- (b) 12000rpm 4℃ 离心 20min;
- (c) 取出 200 μ L 上清液转移到新的离心管中, 加入 5 μ L 试剂 A (留意观察, 有大量气泡产生), 25℃ 静置 5min;
- (d) 再加入 5 μ L 试剂 B (留意观察, 有大量气泡产生, 若没有, 则该试剂失效, 实验不能继续, 请联系厂家咨询), 25℃ 静置 5min。作为上机检测的样本粗提液。

【注】: 1. 根据实验室条件, 可先液氮研磨, 再加提取液, 进行冰浴匀浆; 2. 根据研究需求, 可按组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 10 的比例进行提取。

2. 细菌/细胞样本:

- (a) 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清;
- (b) 取约 5×10^6 个细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次);
- (c) 12000rpm 4℃ 离心 10min, 取上清液待测。
- (d) 取出 200 μ L 上清液转移到新的离心管中, 加入 5 μ L 试剂 A (留意观察, 有大量气泡产生), 25℃ 静置 5min;
- (e) 再加入 5 μ L 试剂 B (留意观察, 有大量气泡产生, 若没有, 则该试剂失效, 实验不能继续, 请联系厂家咨询), 25℃ 静置 5min。作为上机检测的样本粗提液。

【注】: 若增加样本量, 可按照每 $0.5 \sim 1 \times 10^7$ 个细菌/细胞加入 1ml 提取液的比例进行提取。

3. 液体样本:



(a) 取出 200 μL 上清液转移到离心管中, 加入 5 μL 试剂 A (留意观察, 有大量气泡产生), 25 $^{\circ}\text{C}$ 静置 5min;

(b) 再加入 5 μL 试剂 B (留意观察, 有大量气泡产生, 若没有, 则该试剂失效, 实验不能继续, 请联系厂家咨询), 25 $^{\circ}\text{C}$ 静置 5min。作为上机检测的样本粗提液。

二、样品测定:

1. 可见分光光度计预热 30 min, 设置温度在 25 $^{\circ}\text{C}$, 设定波长到 412 nm, 蒸馏水调零。

2. 所有试剂在使用前均须在室温或 25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中温育 10min。

3. 在 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

试剂名称(μL)	测定管
试剂一	400
提取液	240
样本	80
试剂二	40
试剂三	40
立即混匀, 于 412nm 波长下 30s 时读取初始吸光度 A1, 10min 后再测一次吸光度 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】: 1. 严格控制反应温度 25 $^{\circ}\text{C}$, 避免引起较多误差。 2. 若 A 值变化小, 可以适当延长反应时间 (如延长 10min 到 15min 或更长), 若所测 ΔA 的值依然在零点附近徘徊, 可能样本 GR 酶活性低, 建议浓缩样本后再进行测定; 3. ΔA 每分钟的变化幅度宜在 0.005~0.1, 若样本 GR 酶活性过高, 建议样本稀释 2~5 倍后再进行测定。

结果计算:

1. 按蛋白浓度计算

酶活定义: 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 反应条件下, 每毫克蛋白每分钟还原 1nmol GSSG 生成 2nmol GSH 为 1 个酶活单位。

$$\text{GR 酶活}(\text{nmol} / \text{min} / \text{mg prot}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \div 2 \times 10^9 \times V2) \div (Cpr \times V1) \div T \times D = 36.8 \times \Delta A \div Cpr \times D$$



2. 按样本质量计算

酶活定义: 在 25°C 反应条件下, 每克样本每分钟还原 1nmol GSSG 生成 2nmol GSH 为 1 个酶活单位。

$$\text{GR 酶活}(\text{nmol} / \text{min} / \text{g 鲜重}) = (\Delta A \div \varepsilon \div d \div 2 \times 10^9 \times V_2) \div (W \times V_1 \div V) \div T \times D = 36.8 \times \Delta A \div W \times D$$

3. 按细胞/细菌数量计算:

酶活定义: 在 25°C 反应条件下, 每 10⁴ 个细胞/细菌样本每分钟还原 1nmol GSSG 生成 2nmol GSH 为 1 个酶活单位。

$$\text{GR 酶活}(\text{nmol} / \text{min} / 10^4 \text{ cell}) = (\Delta A \div \varepsilon \div d \div 2 \times 10^9 \times V_2) \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.074 \times \Delta A$$

4. 按液体体积计算

酶活定义: 在 25°C 反应条件下, 每毫升液体每分钟还原 1nmol GSSG 生成 2nmol GSH 1 个 酶活单位。

$$\text{GR 酶活}(\text{nmol} / \text{min} / \text{mL}) = (\Delta A \div \varepsilon \div d \div 2 \times 10^6 \times V_2) \div V_1 \div T = 36.8 \times \Delta A$$

ε ----TNB 摩尔消光系数, $1.36 \times 10^4 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$

d ----光径, 1 cm

2 ----1 μmol GSSG 生成 2 μmol GSH

W ----样本质量, g

D ----稀释倍数, 未稀释, 即为 1

V ----提取液体积, 1 mL

V_1 ----加入反应体系中上清液体积, $80 \mu\text{L} = 8 \times 10^{-2} \text{ mL}$

V_2 ----反应体系总体积, $800 \mu\text{L} = 8 \times 10^{-4} \text{ L}$

C_{pr} ----上清液蛋白浓度 (mg/mL)

T ----反应时间, 10min, 若延长反应时间则代入计算公式重新计算

注意事项:

1. 因提取液中含有蛋白质沉淀剂, 因此上清液不能用于蛋白质浓度测定。如需测定蛋白质浓度, 需另取组织测定。



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

2. 样品处理等过程均需在冰上进行, 须在当日测定酶活力, 酶活粗提液避免反复冻融。

3. 试剂三不太稳定, 要严格按照后续说明操作, 谨防失活。

4. 本试剂盒检测时牵涉到氧化还原反应, 所有氧化剂或还原剂都会干扰本试剂盒的测定, 另外硫酸钠、硫酸铵和铁氰化物都会干扰本试剂盒的测定。请尽量避免。

5. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品。

6. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期:

-20℃保存六个月。

