

## Glutathione reductase (GR) Activity Assay Kit

### 谷胱甘肽还原酶（GR）活性测定试剂盒说明书

货号:BN72253| 方法: 可见分光法 | 规格: 48 样

#### 一、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。

本试剂盒采用Ellman方法，DTNB与GR中GSSG还原产生GSH反应，生成黄色产物（TNB）。该产物在412nm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。

#### 二、试剂盒组分与配制:

| 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 | 粉剂 mg×1 支      | -20℃保存 | 用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部，再加 0.3 mL 蒸馏水溶解备用，可-20℃分装冻存，尽量避免反复冻融。 |
| 试剂一  | 粉剂 mg×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  | 粉剂 mg×2 支      | 4℃保存   | 用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部，每支再加 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。                                 |

#### 三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、低温离心机、水浴锅、移液器、蒸馏水。

#### 四、谷胱甘肽还原酶（GR）活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品和实验流程，避免样本和试剂浪费！

##### 1、样本制备

① 组织样本：称取约 0.1g 组织（水分充足样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液，在 4℃ 或冰浴匀浆(或使用各类常见电动匀浆器)。4℃ 约 12,000rpm 离心 10min，取上清待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量(g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，在 4℃ 或冰浴进行匀浆(或使用各类常见电动匀浆器)。4℃ 约 12,000rpm 离心 10min，取上清待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量( $10^4$ ): 提取液(mL)为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本：直接测定。若浑浊，离心后取上清检测。

##### 2、上机检测

本产品仅用于科研

TEL: 010-82422342 www.biorigin.Ltd

- ① 可见分光光度计预热 30 min，设置温度在 25℃，设定波长到 412 nm，蒸馏水调零。
- ② 所有试剂至室温或 25℃水浴锅中温育 10min。
- ③ 试剂一和提取液和试剂三可按照 400:240:40 比例配成混合液（一枪加 680μL 该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用）；可先加样本，再加试剂二（该试剂务必单独加），最后加现配现用的混合液。
- ④ 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，室温（25℃）条件下孵育10min后再读取A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。 |     |

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

## 五、结果计算：

### 1、按蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克蛋白每分钟还原 1nmol GSSG 生成 2nmol GSH 为 1 个酶活单位。

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

### 2、按样本质量计算：

酶活定义：每克样本每分钟还原 1nmol GSSG 生成 2nmol GSH 为 1 个酶活单位。

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

### 3、按细胞/细菌数量计算：

酶活定义：每 10<sup>4</sup> 个细胞/细菌每分钟还原 1nmol GSSG 生成 2nmol GSH 为 1 酶活单位。

$$\text{GR 酶活}(\text{nmol/min/10}^4 \text{ cell}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \div 2 \times 10^9 \times V2) \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.074 \times \Delta A$$

### 4、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟还原 1nmol GSSG 生成 2nmol GSH 1 个酶活单位。

$$\text{GR 酶活}(\text{nmol/min/mL}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \div 2 \times 10^6 \times V2) \div V1 \div T = 36.8 \times \Delta A$$

$\epsilon$ ---TNB 摩尔消光系数，1.36×10<sup>4</sup> L/mol/cm； d---光径，1 cm； 2---1μmol GSSG 生成 2μmol GSH；

V---提取液体积，1 mL； V1---加入体系中样本体积，80μL = 8×10<sup>-2</sup> mL；

W---样本质量，g；

V2---反应体系总体积，800μL = 8×10<sup>-4</sup> L； D---稀释倍数，未稀释即为 1；

T---反应时间，10min；

Cpr---上清液蛋白浓度（mg/mL）； 建议使用本公司 BCA 蛋白质含量检测试剂盒。