

谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 试剂盒说明书

(货号: G0204W48 微板法 48 样)

一、产品简介:

谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx, EC 1.11.1.9) 代表一种具有过氧化物酶活性的酶家族, 在保护生物免受氧化损伤中起重要作用。以往以过氧化氢为底物进行检测, 则会受到分解过氧化氢的过氧化氢酶(Catalase)的干扰, 本试剂盒提供的有机过氧化物试剂(Cum-OOH)不会被过氧化氢酶分解, 因而可以特异地检测出谷胱甘肽过氧化物酶的活力。因此本试剂盒可以定量检测总谷胱甘肽过氧化物酶。

GSH 和 DTNB 反应产生黄色物质, 后者在 412nm 下有最大吸收峰, 而 GSH-Px 催化有机过氧化物试剂 (Cum-OOH) 氧化 GSH, 使 GSH 量减少, GSH 量减少越多, 反应混合液黄色越浅, 则 GSH-Px 活性越大; 反之, 黄色越深, GSH-Px 活性越低。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	4mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	2mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	40mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	5 mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	1mL×1 瓶	4°C保存	若冷藏后呈固体, 可 25°C水浴 5min 融化即可。
标准品	粉体 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、低温离心机、移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性测定:

建议正式实验前选 2 个样本做预测定, 了解样品情况和熟悉实验流程, 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°C 或冰浴匀浆 (或使用各类常见电动匀浆器)。4°C 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°C 或冰浴进行匀浆 (或使用各类常见电动匀浆器)。4°C 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:

① 酶标仪预热 30 min, 调节波长到 412 nm (若无此波长, 可在 420nm 下检测)。

② 用排枪操作, 以减小各孔间因加入试剂时间先后导致的误差。

③ 试剂一到五在 25°C水浴中预热 30min, 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
试剂一	80	80
样本	80	
蒸馏水		80
试剂二	40	40
25°C条件下反应 5min(严格控制时间)		

试剂三	800	800
若有沉淀, 需 12000rpm 室温离心 10min, 上清液待测。		

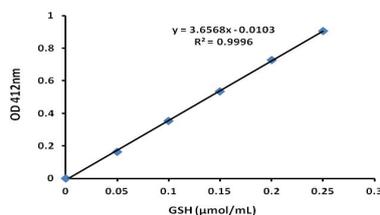
④显色反应: 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
上述步骤的上清液	80	80
试剂四	100	100
试剂五	20	20
反应 2min 后, 于 412nm 波长读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{空白管}} - A_{\text{测定管}}$ 。		

- 【注】:** 1. 最后一步的显色反应, 务必在 5min 之内读取吸光值。若 ΔA 在零附近, 可增大加样量 V1 (如增至 160μL, 则试剂三相应减少, 总体积不变), 或增加第③步反应时间 T (如由 5min 增至 15min 或更长), 或增加样本质量 W。则改变后的 V1 和 T 和 W 需要代入公式重新计算。
2. 若 A 测定值小于 0.1 或 ΔA 大于 0.65, 可减少 V1 (如减至 20μL, 则增加相应体积蒸馏水, 保持总体积不变) 或对样本用蒸馏水稀释后测定, 则改变后的 V1 和稀释倍数 D 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

1. 标准曲线: $y = 3.6568x - 0.0103$ 。x 是 GSH 摩尔浓度: μmol/mL, y 为吸光值 ΔA 。



2. 按蛋白浓度计算:

酶活定义: 在 25°C 反应条件下, 每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol GSH 为 1 个酶活单位。

$$\text{GPx 酶活 (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0103) \div 3.6568 \times 10^3 \times V2] \div (Cpr \times V1) \div T \times D$$

$$= 683.7 \times (\Delta A + 0.0103) \div Cpr \times D$$

3. 按样本质量计算:

酶活定义: 在 25°C 反应条件下, 每克样本每分钟氧化 1nmol GSH 为 1 个酶活单位。

$$\text{GPx 酶活 (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0103) \div 3.6568 \times 10^3 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$= 683.7 \times (\Delta A + 0.0103) \div W \times D$$

4. 按细胞数量计算:

酶活定义: 在 25°C 反应条件下, 每 10⁴ 个细胞每分钟氧化 1nmol GSH 为 1 个酶活单位。

$$\text{GPx 酶活 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0103) \div 3.6568 \times 10^3 \times V2] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$= 683.7 \times (\Delta A + 0.0103) \div 500 \times D$$

5. 按液体体积计算:

活性单位定义: 在 25°C 反应条件下, 每毫升液体每分钟氧化 1nmol GSH 为 1 个酶活单位。

$$\text{GPx 酶活 (nmol/min/mL)} = [(\Delta A + 0.0103) \div 3.6568 \times 10^3 \times V2] \div V1 \div T \times D = 683.7 \times (\Delta A + 0.0103) \times D$$

V---提取液体积, 1 mL;

V1---加入反应体系中上清液体积, 80μL = 0.08 mL;

V2---反应阶段的反应总体积, 1000μL = 1mL;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

W---样本质量, g;

GSH 分子量---307.3;

T---反应时间, 5min;

500---细菌/细胞数量, 万;

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

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (25μmol/mL): 用前使粉体落入底部, 再加 1.6mL 蒸馏水溶解 (-20°C 保存两天)。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度: 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 μmol/mL。
- 3 显色反应阶段, 在 96 孔板中依次加入: 80μL 标准品+100μL 试剂四+20μL 试剂五, 反应 2min 后, 于 412nm 波长读取吸光值 A, 依据结果即可制作标准曲线。