

谷胱甘肽过氧化物酶(GPX,GSH-Px)活性试剂盒

规格：微量法 48 样

检测原理：DTNB 法

编号：ml301022

检测波长：412nm

注意：

正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

GSH-Px 是谷胱甘肽氧化还原循环中催化还原型谷胱甘肽 (GSH) 氧化的主要酶之一。GSH-Px 不仅能够特异地催化还原型谷胱甘肽与 ROS 反应，生成氧化型谷胱甘肽 GSSG，从而保护生物膜免受 ROS 的损害，维持细胞的正常功能；而且具有保护肝脏、提高机体免疫力、拮抗有害金属离子对机体的伤害和增加机体抗辐射等能力。

测定原理：

GSH-Px 活性以催化 GSH 氧化的反应速度，及单位时间内 GSH 减少的量来表示，GSH 和 DTNB 反应在 GSH-Px 催化下可生成黄色产物，于 412nm 下有最大吸收峰，反应液黄色越浅，GSH-Px 活性越高，反应液黄色越深，GSH-Px 活性越低。

自备实验用品及仪器：

低温离心机、水浴锅、可调节移液器、酶标仪、96 孔板、研钵和蒸馏水。

试剂盒组分与配制：

提取液：液体 60 mL×1 瓶，4℃保存。

试剂一：粉剂×1 瓶，4℃避光保存。临用前加入 10mL 蒸馏水溶解。

试剂二：液体 10mL×1 瓶，4℃避光保存。

试剂三：液体 100mL×1 瓶，4℃保存。

试剂四：液体 12mL×1 瓶，4℃保存。

试剂五：粉剂×1 瓶，-20℃避光保存。临用前加入 3mL 蒸馏水溶解。

标准品：粉剂×1 瓶，4℃避光保存。临用前加入 10mL 蒸馏水溶解即为 1μmol/mL GSH。

样品处理：

- 组织：**按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液）进行冰浴匀浆。8000×g，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。
- 细菌、真菌：**按照细胞数量（10⁴个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 8000×g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。
- 血清等液体：**直接测定。

测定操作：

- 分光光度计预热 30 min，调节波长到 412nm，蒸馏水调零。
- 试剂二工作液的配制：**根据样本数量按照试剂二：蒸馏水=1：9 的比例配制，现用现配。
- 将 1μmol/mL GSH 用蒸馏水稀释成 0.1μmol/mL。
- 在 1.5mL 离心管中依次加入：

试剂名称(μL)	测定管	对照管
样本	80	-
试剂一	80	80
37℃反应 5min		
试剂二工作液	40	40
37℃准确反应 5min		

试剂三	800	800
样本	-	80
25°C, 12000rpm,离心 10min		

显色反应：在 96 孔板中依次加入

试剂名称(μL)	测定管	对照管	标准管	空白管
上述步骤上清液	80	80	-	-
标准品	-	-	80	-
蒸馏水	-	-	-	80
试剂四	100	100	100	100
试剂五	20	20	20	20
混匀，室温静置 2min 后于 412nm 波长读取吸光值， ΔA 测定=A 对照管-A 测定管， ΔA 标准=A 标准管-A 空白管。				

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性；
- (2) 细胞中 GSH-Px 活性测定时，细胞数目须在 300 万-500 万之间，细胞中 GSH-Px 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。
- (3) 若 ΔA 大于 0.5 时，需要对样本进行稀释，稀释倍数带入公式计算。若 ΔA 小于 0.05 时，需要增加样品浓度。

GSH-Px 活性计算：

(1) 按蛋白浓度计算

GSH-Px 活性单位定义：每 mg 蛋白每分钟催化 1nmol GSH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{GSH-Px (nmol/min/mg prot)} = \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \times C \text{ 标准} \times 1000 \times V \text{ 酶促} \div V \text{ 样} \div C \text{pr} \div T \times D$$

(2) 按样本质量计算

GSH-Px 活性单位定义：每 g 样本每分钟催化 1nmol GSH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{GSH-Px (nmol/min/g 鲜重)} = \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \times C \text{ 标准} \times 1000 \times V \text{ 酶促} \div V \text{ 样} \times V \text{ 样总} \div W \div T \times D$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：每 10⁴个细胞每分钟催化 1nmol GSH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{GSH-Px (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times C_{\text{标准}} \times 1000 \times V_{\text{酶促}} \div V_{\text{样}} \times V_{\text{样总}} \\ \div \text{细胞数量} \div T \times D$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：每毫升液体每分钟催化 1nmol GSH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{GSH-Px (nmol/min/mL)} = \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times C_{\text{标准}} \times 1000 \times V_{\text{酶促}} \div V_{\text{样}} \div T \times D$$

C 标准：标准品浓度，0.1μmol/mL；

1000：1μmol/mL=1000nmol/mL；

V 酶促：酶促反应总体积，1mL；

V 样：样本加入酶促反应中的体积，0.08mL；

V 样总：样本提取步骤加入提取液体积，1mL；

Cpr：上清液蛋白浓度（mg/mL）；

W：样品质量, g；

细胞数量：以万计；

D:样本稀释倍数；

T：反应时间，5 min。

预实验的意义：

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程，尤其是初次使用生化试剂盒测定；
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整；
- 5、通过 3 - 5 组预实验，判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。