

谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 试剂盒说明书

(货号: RBC0022 酶标仪 96 样)

(一) 检测原理:

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) 试剂组分与配制

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	8mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	4mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	80mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	10 mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	2mL×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) 测定步骤:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

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：

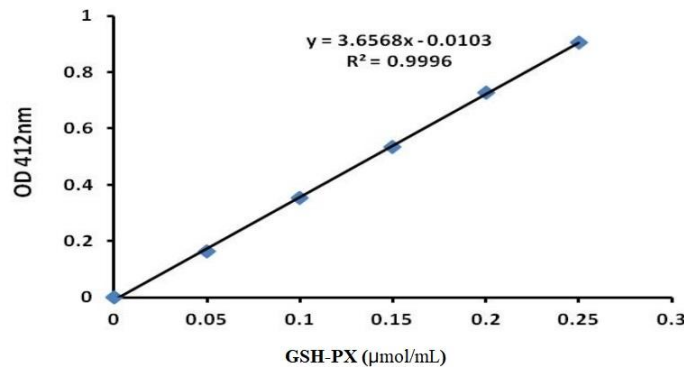
试剂名称 (μL)	测定管	空白管
上述步骤的上清液	80	80
试剂四	100	100
试剂五	20	20
反应 2min 后，于 412nm 波长读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{空白管}} - A_{\text{测定管}}$ 。		

【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。



(五) 结果计算:

1. 标准曲线: $y=kx+b$; x 是 GSH 摩尔浓度: $\mu\text{mol/mL}$; 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 为一个酶活单位。

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

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 为一个酶活单位。

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

4. 按细胞数量计算:

酶活定义: 在 25°C 反应条件下, 每 10^4 个细胞每分钟氧化 1nmol GSH 为一个酶活单位。

GPx 酶活($\text{nmol}/\text{min}/10^4$ cell)= $[(\Delta A-b)\div k\times 10^3\times V2]\div(\text{细胞数量}\times V1\div V)\div T\times D$

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 为一个酶活单位。

GPx 酶活($\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}$)= $[(\Delta A-b)\div k\times 10^3\times V2]\div V1\div T\times D$

V---提取液体积, 1mL ; $V1$ ---加入反应体系中上清液体积, $80\mu\text{L}=0.08\text{mL}$;

$V2$ ---反应阶段的反应总体积, $1000\mu\text{L}=1\text{mL}$; 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 ;

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 ($0.25\mu\text{mol}/\text{mL}$): 临用前甩几下使粉体落入底部, 再加入 1.6mL 蒸馏水溶解, 并用蒸馏水稀释 10 倍的标准品母液 (即用即配, 未用完的可以放置 -20°C 保存 24h)。

2、把母液用蒸馏水稀释成六个浓度: $0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。

3、显色反应阶段, 在 96 孔板中依次加入: $80\mu\text{L}$ 标准品+ $100\mu\text{L}$ 试剂四+ $20\mu\text{L}$ 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

