

谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 试剂盒说明书

(货号: G0204F 分光法 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℃ 保存	
试剂一	4mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	2mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	40mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	20 mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂五	4 mL×1 瓶	4℃ 保存	若冷藏后呈固体状态, 可 25℃ 水浴 5min 融化即可。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃ 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

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、移液器、研钵。

四、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 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 (水分充足的果实样本可取 0.5g), 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×12000rpm 离心 10min, 取上清作为待测样品。

【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, 取上清作为待测样品。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10⁴): 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 可见分光光度计预热 30 min, 调节波长到 412 nm, 蒸馏水调零。

② 试剂一到五在 25℃ 水浴中预热 30min。

③ 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° 条件下反应 5min (严格控制时间)		
试剂三	800	800
12000rpm 离心 10min, 上清液待测		

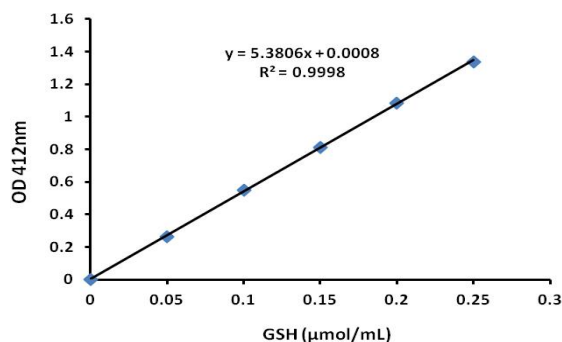
④ 显色反应：在 1mL 玻璃比色皿中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
上述步骤的上清液	320	320
试剂四	400	400
试剂五	80	80
反应 1min, 于 412nm 波长读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{空白管}} - A_{\text{测定管}}$ 。		

【注】：最后一步的显色反应，务必在 5min 之内读取吸光值

五、结果计算：

1. 标准曲线： $y = 5.3806x + 0.0008$ 。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

活性单位定义：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。

$$\begin{aligned} \text{GPx 酶活 (nmol/min/mg prot)} &= [(\Delta A - 0.0008) \div 5.3806 \times 10^3 \times V2] \div (Cpr \times V1) \div T \times D \\ &= 464.6 \times (\Delta A - 0.0008) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

3. 按样本质量计算

活性单位定义：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。

$$\begin{aligned} \text{GPx 酶活 (nmol/min/g 鲜重)} &= [(\Delta A - 0.0008) \div 5.3806 \times 10^3 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 464.6 \times (\Delta A - 0.0008) \div W \times D \end{aligned}$$

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 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{GPx 酶活 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A - 0.0008) \div 5.3806 \times 10^3 \times V2] \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 464.6 \times (\Delta A - 0.0008) \div \text{细胞数量} \times D \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{GPx 酶活 (nmol/min/mL)} &= [(\Delta A - 0.0008) \div 5.3806 \times 10^3 \times V2] \div V1 \div T \times D \\ &= 464.6 \times (\Delta A - 0.0008) \times D \end{aligned}$$

V----提取液体积，1 mL；

V1----加入反应体系中上清液体积，80 μL = 0.08 mL；

V2----反应阶段的反应总体积，1000 μL = 1mL；

D----稀释倍数；

W----样本质量，g；

GSH 分子量----307.3；

T: 反应时间, 5min, 若延长反应时间则代入计算公式重新计算;

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 μ mol/mL): 标准品溶解在 16ml 蒸馏水里面 (母液需在两天内用且-20 $^{\circ}$ C保存)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 μ mol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 显色反应阶段, 在 1mL 玻璃比色皿中依次加入: 320 μ L 标准品+400 μ L 试剂四+80 μ L 试剂五, 反应 1min, 于 412nm 波长读取吸光值 A, 依据结果即可制作标准曲线。