

## 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℃×12000rpm 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:

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, 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		

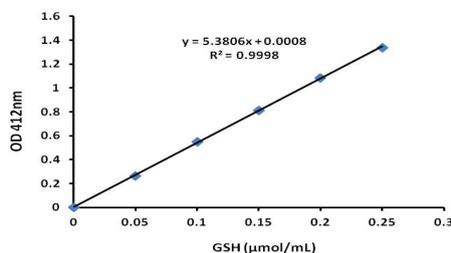
④ 显色反应：在 1mL 玻璃比色皿中依次加入：

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 2min 后，于 412nm 处读取吸光值 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  $\Delta A$  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： $y = 5.3806x + 0.0008$ 。x 是 GSH 摩尔浓度： $\mu\text{mol/mL}$ ，y 为吸光值  $\Delta A$ 。



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。

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

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。

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

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。

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

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。

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

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；

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 (0.25μmol/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 (母液需在两天内用且-20°C 保存)。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 μmol/mL。
- 3 显色反应阶段，在 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中依次加入：320μL 标准品+400μL 试剂四+80μL 试剂五，反应 2min 后于 412nm 波长读取 A，依据结果制作标准曲线。