

谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性试剂盒

规格：微量法 48样

检测原理：DTNB法

编号：JLC_K14911

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

- 1. 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。
- 2. 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。
- 3. 血清等液体：直接测定。**

测定操作

1. 分光光度计预热30 min，调节波长到412nm，蒸馏水调零。
2. 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。
3. 将1μmol/mL GSH用蒸馏水稀释成0.1μmol/mL。
4. 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℃, 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，转移至1mL比色皿中室温静置2min后于412nm波长读取吸光值， $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{对照管}} - A_{\text{测定管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。 | | | | |

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 10^4 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，0.1 $\mu\text{mol/mL}$ ；

1000：1 $\mu\text{mol/mL}$ =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适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。