

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0860

Size: 100T/96S

谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、测定原理:

GSH-Px催化 H_2O_2 氧化GSH, 产生GSSG; 谷胱甘肽还原酶 (GR) 催化NADPH还原GSSG, 再生GSH, 同时NADPH氧化生成 $NADP^+$; NADPH在340nm有特征吸收峰, 而 $NADP^+$ 没有; 通过测定340nm光吸收减少速率来计算GSH-Px活性。

三、需自备的仪器和用品:

低温离心机、水浴锅、可调节移液器、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板 (ZC-1036: UV板)、和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体×1 瓶	室温保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体×1 支	-20℃保存	
试剂四	液体×1 瓶	4℃保存	

混合试剂配制: 临用前, 在试剂二中加入试剂一 20mL, 充分震荡溶解后加入全部试剂三, 混匀。(当天用完)

五、粗酶液提取：

1. 组织：按照组织质量 (g) : 试剂一体积 (mL) 为1: 5~10的比例 (建议称取约0.1g组织, 加入1mL试剂一) 进行冰浴匀浆。8000g, 4°C离心10min, 取上清置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量 (10⁴个) : 试剂一体积 (mL) 为500~1000: 1的比例 (建议500万细胞加入1mL试剂一), 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 8000g, 4°C, 离心10min, 取上清置于冰上待测。
3. 血清等液体：直接测定。

六、GSH-Px 测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热30min, 调节波长到340nm, 蒸馏水调零。
2. 混合试剂在25°C或者37°C (哺乳动物) 水浴中预热30min。
3. 空白管：依次在微量石英比色皿或96孔板 (UV板) 中加入20 μL蒸馏水、160 μL预热的混合试剂, 20 μL试剂四, 迅速混匀后于340nm 处测定第10s和第190s的吸光值, 分别记为A空1和A空2。ΔA空白管= A空1 - A空2。
4. 测定管：依次在微量石英比色皿或96孔板 (UV板) 中加入20 μL上清液、160 μL预热的混合试剂, 20 μL试剂四, 迅速混匀后于340nm处测定第10s和第190s的吸光值, 分别记为A测1和A测2。ΔA 测定管=A测1 - A测2。

七、GSH-Px 活性计算：

● 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1). 按蛋白浓度计算

GSH-Px活力单位定义：一定温度中, 每mg蛋白每分钟催化1nmol NADPH氧化为1个酶活单位。

$$\text{GSH-Px (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A \text{测定管} - \Delta A \text{空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{反总} \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V \text{样}) \div T = 536 \times (\Delta A \text{测定管} - \Delta A \text{空白管}) \div \text{Cpr}$$

(2). 按样本质量计算

GSH-Px 活力单位定义：一定温度中, 每g样本每分钟催化1nmol NADPH氧化为1个酶活单位。

$$\text{GSH-Px (nmol/min/g)} = [(\Delta A \text{测定管} - \Delta A \text{空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{反总} \times 10^9] \div (W \times V \text{样} \div V \text{样总}) \div T = 536 \times (\Delta A \text{测定管} - \Delta A \text{空白管}) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：一定温度中，每 10^4 个细胞每分钟催化 1nmol NADPH氧化为1个酶活单位。

$$\text{GSH-Px (nmol/min/10}^4\text{cell)} = [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 536 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：一定温度中，每毫升液体每分钟催化 1nmol NADPH氧化为1个酶活单位。

$$\text{GSH-Px (nmol/min/mL)} = [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 536 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}})$$

ε : NADPH 摩尔消光系数 $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1 cm ; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$; 10^6 : $1 \text{ mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; C_{pr} : 上清液蛋白浓度 (mg/mL); W : 样品质量; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积, $20 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-2} \text{ mL}$; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1mL ; T : 反应时间, 3 min 。

● 使用96孔板 (UV板) 测定的计算公式如下

(1). 按蛋白浓度计算

GSH-Px活力单位定义：一定温度中，每 mg 蛋白每分钟催化 1nmol NADPH氧化为1个酶活单位。

$$\text{GSH-Px (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1072 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div C_{\text{pr}}$$

(2). 按样本质量计算

GSH-Px活力单位定义：一定温度中，每 g 样本每分钟催化 1nmol NADPH氧化为1个酶活单位。

$$\text{GSH-Px (nmol/min/g)} = [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1072 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：一定温度中，每 10^4 个细胞每分钟催化 1nmol NADPH氧化为1个酶活单位。

$$\text{GSH-Px (nmol/min/10}^4\text{cell)} = [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1072 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：一定温度中，每毫升液体每分钟催化1nmol NADPH氧化为1个酶活单位。

$$\text{GSH-Px (nmol/min/mL)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T$$
$$= 1072 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管})$$

ϵ : NADPH 摩尔消光系数 $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 96孔板 (UV板) 光径, 0.5 cm; V 反总: 反应体系总体积, $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$; 10^6 : $1 \text{ mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; C_{pr} : 上清液蛋白浓度 (mg/mL); W : 样品质量; V 样: 加入反应体系中上清液体积, $20 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-2} \text{ mL}$; V 样总: 提取液体积, 1mL; T : 反应时间, 3min。

八、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力；
- (2) 混合试剂和底物液须临用前配制，配完后置于冰上，当天使用完；
- (3) 测定过程操作须迅速；
- (4) 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。