

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-S0862

Size: 50T/48S

谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

*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 340 nm 有特征吸收峰, 而 $NADP^+$ 没有; 通过测定 340 nm 光吸收减少速率来计算 GSH-Px 活性。

三、需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计、低温离心机、水浴锅、可调节移液器、1mL 石英比色皿和蒸馏水。

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	4℃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 40 mL, 充分震荡溶解后加入全部试剂三, 混匀。(注意: 必须现配现用, 当天使用完)			

五、操作步骤：

● 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 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂一) 进行冰浴匀浆。10000rpm, 4℃离心10min, 取上清置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量 10^4 个: 试剂一体积 (ml) 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 (率300w, 超声3 s, 间隔7s, 总时间3min) 然后10000rpm, 4℃, 离心10min, 取上清置冰上待测。
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 340 nm, 蒸馏水调零。
2. 混合试剂在 25℃或者 37℃ (哺乳动物) 水浴中预热 30min 以上。
3. 空白管：依次在 1mL 石英比色皿中加入 100 μ L 蒸馏水、800 μ L 预热的混合试剂, 100 μ L 试剂四, 迅速混匀后于 340nm 处测定第 10 s 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 1mL 石英比色皿中加入 100 μ L 上清液、800 μ L 预热的混合试剂, 100 μ L 试剂四, 迅速混匀后于 340nm 处测定第 10 s 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。

注意：空白管只需测定一次。

六、GSH-Px 活性计算：

(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 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

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

(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。

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

(3) 按细胞数量计算

GSH-Px 活力单位定义：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。

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

(4) 按液体体积计算

GSH-Px 活力单位定义：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。

$$\text{GSH-Px (U/ml)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \varepsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T = 536 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管})$$

ε : NADPH 摩尔消光系数 $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; V 反总: 反应体系总体积, $1000 \mu\text{L} = 0.001 \text{ L}$; 10^6 : $1\text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; C_{pr} : 上清液蛋白浓度 (mg/mL); V 样: 加入反应体系中上清液体, $100 \mu\text{L} = 0.1 \text{ mL}$; V 样总: 加入提取液体积, 1mL ; W , 样本质量, g ; T : 反应时间, 3min 。

七、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。细胞中GSH-Px活性测定时，细胞数目必须在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。