

上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)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

产品内容：

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）

产品说明：

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。

GSH-Px 催化H₂O₂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。

自备仪器和用品：

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。

操作步骤：

一、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10⁴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。

二、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 μL 蒸馏水、800 μL 预热的混合试剂，100 μL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 μL 上清液、800 μL 预热的混合试剂，100 μL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。

三、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 蛋白每分钟催化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。

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

$$= 536 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

(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。

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

$$= 536 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量}$$

(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。

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

$$= 536 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管})$$

ϵ : NADPH 摩尔消光系数 $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; V 反应: 反应体系总体积, $1000 \mu\text{L} = 0.001 \text{ L}$;

10^6 : $1 \text{ mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; Cpr : 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, 1 mL ; W , 样本质量, g; T : 反应时间, 3 min 。

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。