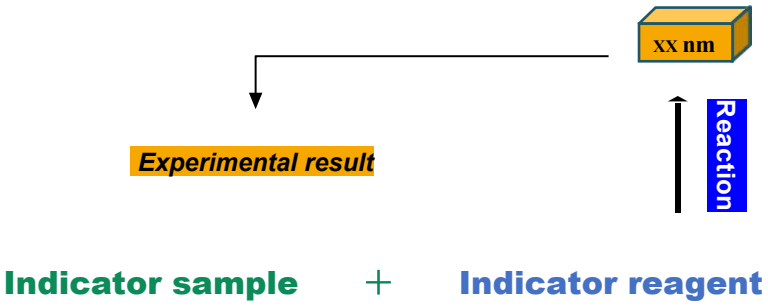
上海茁彩生物科技有限公司

Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

货号：ZC-S0860　　规格：100管/96样

谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）试剂盒说明书

微量法

注意：正式测定之前选择 2-3个预期差异大的样本做预测定。

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。

自备仪器和用品：

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（UV板）、和蒸馏水。

试剂组成和配置：

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）			

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℃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）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℃，离心10min，取上清置于冰上待测。
3. 血清等液体：直接测定。

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℃或者37℃（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20μL蒸馏水、160μL预热的混合试剂，20μL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。△A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20μL上清液、160μL预热的混合试剂，20μL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。△A 测定管=A测1－A测2。

GSH-Px 活性计算：

a.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。

GSH-Px（nmol/min/mg prot)=[(△A测定管-△A空白管)÷ε÷d×V 反总×10^9]÷（Cpr×V 样）÷T=536×(△A 测定管-△A 空白管)÷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。

GSH-Px（nmol/min/g)=[(△A 测定管-△A 空白管)÷ε÷d×V 反总×10^9]÷(W×V 样÷V 样总)÷T=536×(△A 测定管-△A 空白管)÷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。

GSH-Px（nmol/min/10^4cell)= [(△A测定管-△A空白管)÷ε÷d×V反总×10^9]÷(细胞数量×V样÷V样总)÷T=536×(△A 测定管-△A 空白管)÷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。

GSH-Px（nmol/min/mL)=[(△A 测定管-△A 空白管)÷ε÷d×V 反总×10^9]÷V 样÷T=536×(△A 测定管-△A 空白管)

ε：NADPH 摩尔消光系数 6.22×10^3 L/mol/cm；d：比色皿光径，1 cm；V 反总：反应体系总体积，200μL=2×10^{-4} L；10^6：1 mol=1×10^6μmol； Cpr：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，20μL =2×10^{-2} mL；V 样总：提取液体积，1mL；T：反应时间，3 min。

b.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。

GSH-Px（nmol/min/mg prot)=[(△A 测定管-△A 空白管)÷ε÷d×V 反总×10^9]÷（Cpr×V 样）÷T=1072×(△A 测定管-△A 空白管)÷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。

GSH-Px（nmol/min/g)=[(△A 测定管-△A 空白管)÷ε÷d×V 反总×10^9]÷(W×V 样÷V 样总)÷T=1072×(△A 测定管-△A 空白管)÷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。

GSH-Px（nmol/min/10^4cell)= [(△A测定管-△A空白管)÷ε÷d×V反总×10^9]÷(细胞数量×V样÷V样总)÷T=1072×(△A 测定管-△A 空白管)÷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。

GSH-Px（nmol/min/mL)=[(△A 测定管-△A 空白管)÷ε÷d×V 反总×10^9]÷V 样÷T=1072×(△A 测定管-△A 空白管)

ε：NADPH 摩尔消光系数 6.22×10^3 L/mol/cm；d：96孔板（UV板）光径，0.5 cm；V 反总：反应体系总体积，200μL=2×10^{-4} L；10^6：1 mol=1×10^6μmol； Cpr：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，20μL =2×10^{-2} mL；V 样总：提取液体积，1mL；T：反应时间，3min。

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