

谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性检测试剂盒 (微量法)
(本试剂盒仅供科研使用)**产品包装**

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0249	谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性检测试剂盒 (微量法)	100 管/96 样

产品内容

名称	规格	储存条件
试剂一	液体 120mL × 1 瓶	室温
试剂二	粉剂 × 2 瓶	4℃
试剂三	液体 5μL × 2 支	-20℃
试剂四	液体 200μL × 1 瓶	4℃

一、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, 而且还具有保护肝脏、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 催化有机过氧化物氧化 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, 可以来计算 GSH-Px 活性。

二、自备材料

酶标仪、水浴锅、低温离心机、可调式移液器、96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

三、样品准备

- 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、细胞/细菌: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10⁴ 个): 试剂一体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一), 冰浴超声波破碎细菌或细胞 (功率 300W, 超声 3s, 间隔 7s, 总时间 3min); 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
- 3、液体样本: 直接检测。

四、操作步骤

正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

- 1、酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- 2、混合试剂的配置: 临用前, 取试剂二 1 瓶, 加入试剂一 10mL, 充分震荡混匀后, 取少量混合液于一瓶试剂三中, 充分混匀后再转移至试剂二中, 混匀待用。(当天用完)
- 3、混合试剂置于 25℃ (一般物种) 或者 37℃ (哺乳动物) 水浴中保温 30min。
- 4、试剂四的稀释: 临用前吸取 21.5μL 试剂四, 加入 5mL 蒸馏水充分混匀, 配制好的试剂

当天用完。

5、依次在 96 孔板中加入 20 μ L 上清液、160 μ L 预热的混合试剂、20 μ L 稀释后的试剂四, 迅速混匀于 340nm 处测定第 30s 和第 210s 的吸光值, 分别记为 A1 和 A2。 ΔA 测定管=A1-A2。

五、活性的计算

1、按照组织蛋白浓度计算

酶活单位定义: 一定温度下, 每 mg 蛋白每 min 催化 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{GSH-Px (nmol/min/mg prot)} = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1072 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2、按照样本鲜重计算

酶活单位定义: 一定温度下, 每 g 样本每 min 催化 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{GSH-Px (nmol/min/g 鲜重)} = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1072 \times \Delta A \div W$$

3、按照细菌/细胞数量计算

酶活单位定义: 一定温度下, 每 10⁴ 个细胞每 min 催化 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{GSH-Px (nmol/min/10}^4\text{ceLL)} = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1072 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

4、按照液体体积计算

酶活单位定义: 一定温度下, 每 mL 液体每 min 催化 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{GSH-Px (nmol/min/mL)} = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div V_{\text{样}} \div T = 1072 \times \Delta A$$

ϵ : NADPH 摩尔消光系数 6.22 $\times 10^3$ L/mol/cm; d: 96 孔板光径, 0.5cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 200 μ L=2 $\times 10^{-4}$ L; 10^9 : 1mol=1 $\times 10^9\mu$ 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 μ L=2 $\times 10^{-2}$ mL; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 3min。

六、注意事项

- 1、样品 处理等过程均需在冰上进行, 且需在当日测定酶活。
- 2、混合试剂和底物液需临用前配制, 配完后置于冰上, 当天使用完。
- 3、操作保持迅速。
- 4、细胞中 GSH-Px 活性测定时, 细胞数量需要在 300 万-500 万之间, 细胞中 GSH-Px 提取时, 可加试剂一后研磨或超声处理, 不能用细胞裂解液处理细胞。