

组织及血液谷胱甘肽过氧化物酶（GPX）检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AMHB6-C24	组织及血液谷胱甘肽过氧化物酶（GPX）检测试剂盒	24T	常量法

产品说明:

谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione peroxidase, GSH-Px 或 GPX，EC.1.11.1.9）是机体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解酶。GPX 能够催化还原型谷胱甘肽（GSH）生成氧化型谷胱甘肽（GSSG），使有毒的过氧化氢还原成无毒的羟基化合物。

GPX 催化 H_2O_2 氧化 GSH，产生 GSSG，GSH 能与 DTNB 生成在 412nm 处有特征吸收峰的化合物，412nm 下吸光度的下降即可反应 GPX 的活性。

试剂组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂一	粉剂×2 瓶	2-8℃ 保存
试剂二	液体 10 μ L×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂三	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂四	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂五	液体 10 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃ 保存
稀释液	液体 4 mL×1 瓶	2-8℃ 保存

溶液的配制:

- 1、试剂一：临用前取一瓶加入 1.65mL 蒸馏水溶解，2-8℃ 可保存 2 周；
- 2、试剂一工作液：临用前根据样本数量按照试剂一：稀释液=1:1 的比例进行配制，现用现配；
- 3、试剂二工作液：液体放于试剂瓶内 EP 管中，使用前先离心。临用前按 2 μ L 试剂二：10 mL 蒸馏水的比例稀释试剂二，现用现配；
- 4、试剂三：瓶底若有结晶可 50℃ 水浴溶解，此溶液为饱和溶液，若底部最终还有结晶，吸取上清使用即可；
- 5、试剂四：若试剂有析出可 40℃ 加热溶解，也可震荡促进溶解；
- 6、标准品：10 mg 还原型谷胱甘肽。临用前加入 0.405 mL 蒸馏水溶解为 80 μ mol/mL 的标准溶液备用，2-8℃ 可保存 4 周。

操作步骤:

一、样本处理

- 1、组织：按照组织质量（g）:提取液体积（mL）为 1:5~10 的比例（建议称取 0.05 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆。5000 rpm，4℃ 离心 10 min，取上清置冰上待测（如上清不清澈可以离心更长时间）。

2、细菌、细胞：按照细胞数量 10^4 个：提取液体积 (mL) 500~1000:1 的比例（建议500 万细胞加入 1 mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率300w，超声3s，间隔7s，总时间3 min）然后5000 rpm，4℃，离心10min，取上清置冰上待测（如上清不清澈可以离心更长时间）。

3、血清（浆）等液体：直接测定。

二、测定步骤

1、分光光度计预热30min 以上，调节波长至412nm，蒸馏水调零。

2、将80 $\mu\text{mol/mL}$ 标准液用蒸馏水稀释为0.08 $\mu\text{mol/mL}$ 的标准溶液，现用现配。（可取10 μL 80 $\mu\text{mol/mL}$ 标准液和990 μL 蒸馏水混合配成0.8 $\mu\text{mol/mL}$ 的标准溶液，再取100 μL 0.8 $\mu\text{mol/mL}$ 的标准溶液和900 μL 蒸馏水混合配成0.08 $\mu\text{mol/mL}$ 的标准溶液）

3、操作表：

(1) 酶促反应（1.5 mL 离心管中依次加入下列试剂）：

	测定管	对照管
样本上清液 (μL)	100	-
试剂一工作液 (μL)	100	100
37℃下预热5min		
试剂二工作液 (μL)	50	50
37℃下反应5min		
试剂三 (μL)	1000	1000
样本上清液 (μL)	-	100
充分混匀，4000 rpm 常温离心 10 min，取上清于新的 1.5mL EP 管中。		

(2) 显色反应：

试剂名称(μL)	测定管	对照管	标准管	空白管
蒸馏水	-	-	-	500
上清液	500	500	-	-
标准液	-	-	500	-
试剂四	500	500	500	500
试剂五	125	125	125	125
充分混匀，室温静置 15 min。尽快测定412 nm 下的吸光度，分别记为A 测定管、A 对照管、A 标准管、A 空白管。计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{对照管}} - A_{\text{测定管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。空白管和标准管仅需做 1-2 次。				

三、GPX 活性计算

1、抑制百分率的计算

$$\text{抑制百分率} = (A_{\text{对照管}} - A_{\text{测定管}}) \div (A_{\text{对照管}} - A_{\text{空白管}}) \times 100\%$$

尽量使样本的抑制百分率在30-70%范围内，越靠近50%越准确。如果计算出来的抑制百分率小于30%或大于70%，则通常需要调整加样量后重新测定。如果测定出来的抑制百分率偏高，则需适当稀释样本；如果测定出来的抑制百分率偏低，则需重新准备浓度比较高的待测样本。

2、GPX 活性计算

(1) 按蛋白浓度计算

活力单位定义：每 mg 蛋白在反应体系中每分钟催化 1 nmol GSH 氧化定义为一个酶活力单位。

$$\text{GPX (U/mg prot)} = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标}) \times 1000 \times V \text{ 酶促} \div (Cpr \times V \text{ 样}) \\ \div T = 200 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div Cpr$$

(2) 按样本质量计算

活力单位定义：每g 样本在反应体系中每分钟催化 1 nmol GSH 氧化定义为一个酶活力单位。

$$\text{GPX (U/g 质量)} = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标}) \times 1000 \times V \text{ 酶促} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T \\ = 200 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活力单位定义：每 10⁴ 个细胞在反应体系中每分钟催化 1 nmol GSH 氧化定义为一个酶活力单位。

$$\text{GPX (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标}) \times 1000 \times V \text{ 酶促} \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \\ \div T = 200 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

活力单位定义：每mL 液体在反应体系中每分钟催化 1nmol GSH 氧化定义为一个酶活力单位。

$$\text{GPX (U/mL)} = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标}) \times 1000 \times V \text{ 酶促} \div V \text{ 样} \div T \\ = 200 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准}$$

C 标：标准液混合物的浓度：0.08 μmol/mL；V 酶促：酶促反应体系体积，1.25 mL；V 样：酶促反应中加入的样本体积，0.1 mL；V 样总：提取液体积，1 mL；Cpr：上清液蛋白浓度，mg/mL；T：反应时间，5 min；细胞数量：以万计；W：样本质量，g；1000：换算系数，1 μmol=1000nmol。

注意事项：

- 1、吸光度若大于 1.2 时，建议将样本用提取液稀释后进行测定。
- 2、建议一次不要做过多样本以免检测时间过长影响显色，使测定不准确。