

# 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-M48	组织及血液谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)检测试剂盒	48T	微量法

## 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	粉剂×2 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 10 μL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体30mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	液体 5mL×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：临用前按2 μL 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 μmol/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0.05g组织,加入1mL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1mL提取液),冰浴超声波破碎细胞(功率300w,超声3s,间隔7s,总时间3min)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/酶标仪预热30min以上,调节波长至412 nm,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  $\mu\text{L}$  80  $\mu\text{mol/mL}$ 标准液和990  $\mu\text{L}$ 蒸馏水混合配成0.8  $\mu\text{mol/mL}$ 的标准溶液,再取100  $\mu\text{L}$  0.8  $\mu\text{mol/mL}$ 的标准溶液和900  $\mu\text{L}$ 蒸馏水混合配成0.08  $\mu\text{mol/mL}$ 的标准溶液)
- 3、操作表:(在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( $\mu\text{L}$ )	20	-
试剂一工作液( $\mu\text{L}$ )	20	20
37℃下预热5min		
试剂二工作液( $\mu\text{L}$ )	10	10
37℃下反应5min		
试剂三( $\mu\text{L}$ )	200	200
样本上清液( $\mu\text{L}$ )	-	20

充分混匀, 4000 rpm 常温离心5 min, 取上清于EP管或者96孔板中。

试剂名称( $\mu\text{L}$ )	测定管	对照管	标准管	空白管
蒸馏水	-	-	-	100
上清液	100	100	-	-
标准液	-	-	100	-
试剂四	100	100	100	100
试剂五	25	25	25	25

充分混匀,室温静置15 min,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。

$$\text{GPX (U/mg prot)} = \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标}}) \times 1000 \times V_{\text{酶促}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \\ = 200 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

(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。

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

(3) 按细胞数量计算

活力单位定义：每  $10^4$  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 1 nmol 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  $\mu\text{mol/mL}$ ；V 酶促：酶促反应体系体积，0.25 mL；V 样：酶促反应中加入样本体积，0.02 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  $\mu\text{mol}=1000\text{nmol}$ 。

**注意事项：**

- 1、吸光度若大于 1.5 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。