

谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
PYHA7-M48	谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)活性检测试剂盒	48T	微量法
PYHA7-M96		96T	

一、测定意义：

谷胱甘肽过氧化物酶（Glutathione peroxidase, GPX）是机体内广泛存在的一种重要的催化过氧化氢分解的酶。它特异的催化还原型谷胱甘肽（GSH）对过氧化氢的还原反应，可以起到保护细胞膜结构和功能完整的作用。GPX的活性中心是硒半胱氨酸，硒是 GPX 的必需部分，每克分子酶含4克原子硒。测定GPX的活力可以作为衡量机体硒水平的一项生化指标。

二、测定原理：

谷胱甘肽过氧化物酶（GPX）可以促进过氧化氢（H₂O₂）与还原型谷胱甘肽（GSH）反应生成 H₂O 及氧化型谷胱甘肽（GSSG），谷胱甘肽过氧化物酶的活力可用其酶促反应的速度来表示，测定此酶促反应中还原型谷胱甘肽（GSH）的消耗，则可求出酶的活力。

三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(48T)	试剂装量(96T)	保存条件
提取液	液体 60mL×1 瓶	液体 120mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 1ml×1 瓶	液体 2ml×1 瓶	2-8℃保存
试剂二应用液：用时取 0.1mL 加蒸馏水至 10mL，等同于 100 倍稀释配成应用液，现用现配。			
试剂二	液体 60mL×1 瓶	液体 120mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 15mL×1 瓶	液体 30mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 3mL×1 瓶	液体 6mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品（ GSH ）	粉剂×1 支	粉剂×2 支	2-8℃保存
10mmol/L GSH 溶液	每支 GSH 标准品粉剂加入双蒸水 1ml，充分溶解，现用现配。		
1mmol/L GSH 溶液	取 10mmol/L GSH 溶液用试剂二 10 倍稀释，充分混匀，现用现配。		

四、操作步骤：

样本前处理

取一定量植物组织擦净水分及杂质，剪碎后放入研钵，加入液氮，研磨成粉状后转移出来，然后准确称重，按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），旋涡混匀抽提 3-5 分钟或者使用组织破碎仪冰浴提取，8000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

五、测定步骤

1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 405nm，蒸馏水调零。

- 2、测定前将试剂恢复至常温；
- 3、将1mmol/L标准品用试剂三依次稀释至0、20、40、60、80、100nmol/mL，备用；
- 4、操作表：

(1) 酶促反应（在离心管中加入以下试剂）：

	对照管	测定管
1mmol/L GSH 标准液（ μL ）	50	50
样本（ μL ）	-	25
充分混匀，试剂二 37°C 预温 5min		
试剂一（ μL ）	25	25
充分混匀，37°C准确反应 10min		
试剂二（ μL ）	500	500
样本（ μL ）	25	-
充分混匀，4000rpm/min 离心 10min，取上清液进行显色反应。		

(2) 显色反应（在96孔板中加入以下试剂）：

	对照管	测定管	空白管	标准管
1mmol/L GSH 标准液（ μL ）	-	-	-	100
试剂二（ μL ）	-	-	100	-
上清液（ μL ）	100	100	-	-
试剂三（ μL ）	100	100	100	100
试剂四（ μL ）	25	25	25	25
混匀，空白管调零，于波长 405nm 测定各管吸光度。 $\Delta A = A_{\text{非酶管}} - A_{\text{酶管}}$				

六、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)活性计算：

- 1、标准曲线绘制：以吸光度值为横坐标，标准品浓度为纵坐标，绘制标准曲线 $y = kx + b$ ， x 为吸光度值， y 为标准品浓度（nmol/mL）。根据标准曲线，将 ΔA 带入公式计算出样本浓度（ y ，nmol/mL）；

2、样本GPX/GPX计算

1) 按照样本鲜重计算

单位定义：每克组织每分钟消耗 1nmol GSH 的量为一个酶活力单位。

$$\text{GPX(U/g鲜重)} = y \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T$$

2) 按照样本蛋白浓度计算

单位定义：每毫克蛋白每分钟消耗 1nmol GSH 的量为一个酶活力单位。

$$\text{GPX(U/mg prot)} = y \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$

$V_{\text{反总}}$: 反应总体积 0.6mL;

$V_{\text{样}}$: 样本取样量 0.025mL;

$V_{\text{样总}}$: 提取液体积 1mL;

Cpr: 蛋白浓度 mg/mL;

T: 反应时间 10min;

七、 注意事项:

- 1、 不同样本 GPX 活性差异较大, 选择部分样本进行预实验。根据预实验结果, 样本稀释或者加大取样量, 计算公式根据实际情况进行修改。
- 2、 试剂一需现用现配。测定上清液当天提取, 当天测试。