

总谷胱甘肽过氧化物酶活性检测试剂盒

(货号: SH3020 酶标法 96T)

一、产品简介

谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GPx, EC 1.11.1.9) 代表一种具有过氧化物酶活性的酶家族, 它可以清除活细胞内的过氧化物, 在保护细胞免受自由基损伤过程中起着关键作用。细胞内的脂类容易和自由基发生反应, 产生脂类过氧化物。谷胱甘肽过氧化物酶可以利用还原型谷胱甘肽(GSH)还原脂类过氧化物, 从而消除自由基的毒害作用。

二、检测原理

本试剂盒采用 DTNB 比色法: GPx 催化有机过氧化物 (Cum-OOH) 氧化 GSH 生成 GSSG。反应剩余的 GSH 与 DTNB 反应, 生成黄色的 TNB。该产物在 412 nm 波长处有特征吸收峰, 吸光度值与剩余 GSH 含量成正比, 与 GPx 活性成反比。

三、试剂盒组分与规格

试剂名称	规格	保存条件	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×2 瓶	4℃避光保存	使用前甩几下或 4℃离心使试剂落入底部, 再加 1mL 蒸馏水溶解; 溶解后-20℃保存 2 周。
试剂三	液体 200uL×1 瓶	4℃避光保存	取 10uL 试剂三加入 5mL 蒸馏水混匀, 4℃保存。
试剂四	液体 1.5mL×1 瓶	4℃避光保存	出现固体时可以 25℃水浴 5min, 使固体完全溶解呈液体状态。
标准品	粉剂×1 瓶	4℃避光保存	若制作标曲, 则用到该试剂

四、所用到的仪器和用品

酶标仪、台式低温离心机、恒温水浴锅、可调式移液器、96 孔板、匀浆器、蒸馏水。

五、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 活性测定

正式实验前务必选取 2-3 个预期差异较大的样本做测定，了解本批样本情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

①组织样本：称取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，在 4℃ 12000g 离心 10min，取上清待测。

【注】若增加样本量，可以按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例进行提取。

②细菌/细胞样本：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）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000g 4℃ 离心 10min，取上清待测。

③液体样本：直接检测，若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测

①酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 412nm。

②所有试剂在使用前解冻至室温或 25℃ 水浴锅温育 10min。

③用排枪操作，以减小各孔间因加入试剂时间先后导致的误差。

④在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	空白管
试剂一	160	170
试剂二	10	10
样本	10	
试剂三	10	10
25℃ 条件下反应 10min。		
试剂四	10	10
立即混匀，25℃ 条件下孵育 2min，在 412nm 波长读取吸光度 A， $\Delta A = A_{\text{空白管}} - A_{\text{测定管}}$ 。		

【注】：第一步反应时，孵育 10min 即可，如测定管与空白管测值非常接近，说明酶活性较低，可以适当增加孵育时间至 30min 或增加样本量（试剂一的加入量相应减少）。

六、结果计算

1、根据标准曲线，计算 ΔA 对应的标准品 GSH 浓度 C（单位为 μmol/mL）。例如本说明书中的标准曲线为 $y = 0.6209x - 0.0028$ ，则

$$C = (\Delta A + 0.0028) / 0.6209$$

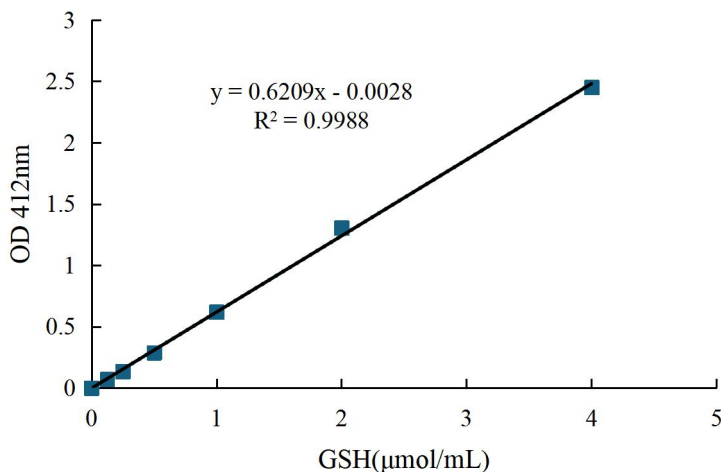


图 1 GPx 酶活检测试剂盒的标准曲线效果图，图中数据仅供参考。

2、按照蛋白浓度计算：

酶活定义：在 25℃反应条件下，每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol GSH 为 1 个酶活单位。

$$\text{GPx 酶活}(\text{nmol/min/mg prot}) = C \times 10^3 \times V1 \div (Cpr \times V1) \div T \times D$$

3、按照样本鲜重计算：

酶活定义：在 25℃反应条件下，每克样本每分钟氧化 1nmol GSH 为 1 个酶活单位。

$$\text{GPx 酶活}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = C \times 10^3 \times V1 \div (W \times V1 \div V) \div T \times D$$

4、按照细菌或细胞数量计算：

酶活定义：在 25℃反应条件下，每 10⁴ 个细菌/细胞每分钟氧化 1nmol GSH 为 1 个酶活单位。

$$\text{GPx 酶活}(\text{nmol/min}/10^4\text{cell}) = C \times 10^3 \times V1 \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D$$

5、按照液体体积计算：

酶活定义：在 25℃反应条件下，每毫升液体每分钟氧化 1nmol GSH 为 1 个酶活单位。

$$\text{GPx 酶活}(\text{nmol/min/mL}) = C \times 10^3 \div T \times D$$

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.01mL；

500---细胞数量，万；

T---反应时间，10min；

W---样本质量，g；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL，推荐使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒（货号：AR0146）。



七、标准曲线制作

- 1、制备标准品母液（10 μ mol/mL）：标准品溶于 0.976 mL 蒸馏水中（母液需在两天内用且-20 $^{\circ}$ C保存）。
- 2、把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品：0，0.05，0.1，0.2，0.4，0.8 μ mol/mL。也可以根据实际样本来调整校准品浓度。
- 3、在 96 孔板中依次加入：10 μ L 标准品+180 μ L 试剂一+10 μ L 试剂四，25 $^{\circ}$ C反应 2min 后，于 412nm 波长读取吸光值 A，依据结果即可制作标准曲线。