

谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)活性检测试剂盒说明书

Glutathione Peroxidase Assay Kit

分光光度法

货号: AK090

规格: 50T/24S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK090-提取液	30mL×1 瓶	4℃保存;
AK090-A	粉剂×2 支	4℃保存, 临用前加入 3.3 mL 稀释液, 充分溶解;
AK090-B	10ul×1 瓶	4℃保存; 临用前按 1: 5000 用蒸馏水按量稀释, 现用现配;
AK090-C	60mL×1 瓶	4℃保存; 若有结晶可用 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;
AK090-D	30ml×1 瓶	4℃保存;
AK090-E	10ml×1 瓶	4℃保存;
AK090-标准品	粉剂×1 支	4℃保存, 临用前加入 0.405 mL 稀释液溶解为 80 μmol/mL 的标准溶液备用;
AK090-稀释液	20mL×1 瓶	4℃保存。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px/GPX) 是机体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解酶, 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。GPX 不仅能够特异地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 的伤害, 维持细胞的正常功能; 而且具有保护肝脏、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。

原理: GPX 催化 H₂O₂ 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。

自备用品:

可见分光光度计、天平、1ml 玻璃比色皿、离心机、水浴锅、可调式移液枪、研钵、冰和双蒸水。

粗酶液提取:

1. 细菌或培养细胞: 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 300W, 超声 3s, 间隔 7s, 总时间 3min); 然后 5000 rpm, 4℃离心 10min (若上清不清澈可以延长离心时间), 取上清, 置冰上待测。
2. 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 (若上清不清澈可以延长离心时间), 取上清置冰上待测。
3. 血清 (浆) 样品: 直接检测。

测定步骤:

1. 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 412nm, 蒸馏水调零。
2. 将 80 μmol/mL 标准液用稀释液稀释为 0.08 μmol/mL 的标准溶液, 现用现配。

3. 测定操作表:

试剂名称	测定管 (ul)	对照管 (ul)
样本上清液	100	
AK090-A	100	100
37℃下预热 5min		
AK090-B	50	50
37℃下预热 5min		
AK090-C	1000	1000
样本上清液		100
充分混匀, 4000 rpm 常温离心 5 min, 取上清于 EP 管或 96 孔板中。		

试剂名称	测定管(ul)	对照管(ul)	标准管(ul)	空白管(ul)
稀释液				500
上清液	500	500		
标准液			500	
AK090-D	500	500	500	500
AK090-E	125	125	125	125
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, 并计算 $\Delta A_{测定} = A_{对照管} - A_{测定管}$, $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管}$ 。				

注意: 空白管和标准管分别只需测定 1-2 次。

GPX 酶活性计算:

1. 抑制百分率的计算:

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

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

GPX 活性单位定义: 每 mg 蛋白每分钟催化 1nmol GSH 氧化为 1 个酶活单位。

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

(2) 按样本质量计算

GPX 活力单位定义: 每 g 样本每分钟催化 1nmol GSH 氧化为 1 个酶活单位。

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

(3) 按细胞数量计算

GPX 活性单位定义: 每 10^4 个细胞每分钟催化 1nmol GSH 氧化为 1 个酶活单位。

计算公式: $GPX (U/10^4 \text{ cell}) = \Delta A_{测定} \div (\Delta A_{标准} \div C_{标}) \times 1000 \times V_{酶促} \div (\text{细胞数量} \times V_{样} \div V_{样总}) \div T$
 $= 200 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div \text{细胞数量}$

(4) 按液体体积计算

GPX 活性单位定义: 每毫升液体每分钟催化 1nmol GSH 氧化为 1 个酶活单位。

计算公式: $GPX (U/mL) = \Delta A_{测定} \div (\Delta A_{标准} \div C_{标}) \times 1000 \times V_{酶促} \div V_{样} \div T$

$=200 \times \Delta A$ 测定 $\div \Delta A$ 标准

注：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，1.25 mL；V 样：酶促反应中加入样本体积，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 $\mu\text{mol}=1000 \text{ nmol}$ 。

注意事项：

1. 样品处理等过程均需要在冰上进行，且须在当日测定酶活力；
2. 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。
3. 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。