

## 谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)活性检测试剂盒说明书

### Glutathione Peroxidase Assay Kit

微量法

货号：AK091

规格：100T/48S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
AK091-提取液	60mL×1 瓶	4℃保存；
AK091-A	粉剂×2 支	4℃保存，临用前加入 3.3 mL 稀释液，充分溶解；
AK091-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；
AK091-C	30mL×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；
AK091-D	15ml×1 瓶	4℃保存；
AK091-E	5ml×1 瓶	4℃保存；
AK091-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；
AK091-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 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。

自备用品：

可见分光光度计/酶标仪、天平、微量玻璃比色皿/96 孔板、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（10<sup>4</sup> 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	20	
AK091-A	20	20
37℃下预热 5min		
AK091-B	10	10
37℃下预热 5min		
AK091-C	200	200
样本上清液		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	测定管(ul)	对照管(ul)	标准管(ul)	空白管(ul)
稀释液				100
上清液	100	100		
标准液			100	
AK091-D	100	100	100	100
AK091-E	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 $\Delta A_{测定} = A_{对照管} - A_{测定管}$ , $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管}$ 。				

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，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. 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 1.5 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。