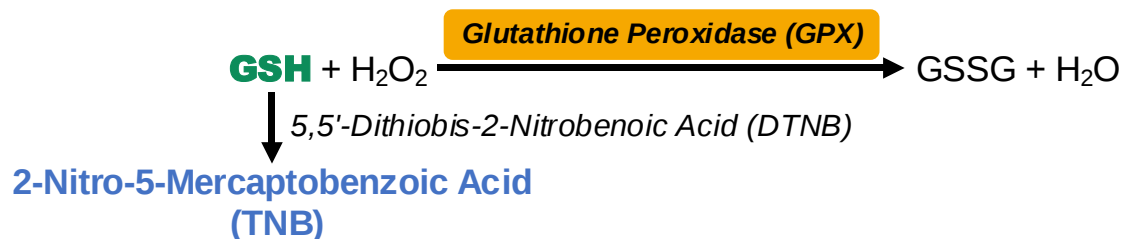




谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX) 活性检测试剂盒
Glutathione Peroxidase (GPX) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX) 活性检测试剂盒

Glutathione Peroxidase (GPX) Activity Assay Kit

一、产品描述

谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX) 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, 从而保护生物膜免受 ROS 的损害, 维持细胞的正常功能, 同时还具有保护肝脏、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作用。

谷胱甘肽过氧化物酶可催化 H_2O_2 氧化 GSH 生成 GSSG, GSH 和 5,5'-二巯代-双-(2-硝基苯甲酸) 反应生成黄色的 2-硝基-5-巯基苯甲酸, 产物在 412 nm 处具有特征吸收峰, 通过吸光值下降速率即可表征谷胱甘肽过氧化物酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂一	粉剂×2 瓶	4°C保存	使用前每瓶加入 1.65 mL 蒸馏水充分溶解 (配制后 4°C可以保存 2 周)
试剂二	液体 10 μ L×1 支	4°C保存	按照试剂二: 蒸馏水=1:5000 的体积比配制 (即为试剂二应用液, 根据使用量现用现配)
试剂三	液体 30 mL×1 瓶	4°C保存	若有结晶析出, 50°C水浴溶解后使用 (饱和溶液, 若始终有结晶析出, 吸取上清使用)
试剂四	液体 15 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂五	液体 5 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂六	液体 4 mL×1 瓶	4°C保存	-
标准品	粉剂×1 支 (10 mg 还原型谷胱甘肽)	4°C保存	使用前加入 405 μ L 蒸馏水充分溶解 (即为 80 μ mol/mL 还原型谷胱甘肽标准液)
标准应用液的制备 (现用现配): 使用前将 80 μ mol/mL 还原型谷胱甘肽标准液使用蒸馏水稀释至 0.08 μ mol/mL 即为标准应用液。			

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂: 可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿 (光径 10 mm) /96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

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 0.05 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细胞数量（ 10^4 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 1 mL 提取液）处理样品，冰浴超声破碎（功率 300 W，超声 3 s，间隔 7 s，总时间 3 min），4℃ 8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

③血清（浆）、培养液等液体样本：直接测定或适当稀释后再进行测定。

2.测定步骤

①分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 412 nm，蒸馏水调零。

②检测工作液的制备（现用现配）：使用前根据使用量，按试剂一：试剂六=1:1 的体积比配制，充分混匀即为检测工作液。

③在离心管中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μ L)	对照组 (μ L)	标准组 (μ L)	空白组 (μ L)
粗酶液	20	-	-	-
检测工作液	20	20	-	-
充分混匀，37℃孵育 5 min				
试剂二应用液	10	10	-	-
充分混匀，37℃准确反应 5 min				
试剂三	200	200	-	-
粗酶液	-	20	-	-
充分混匀，8000 g 常温离心 10 min，取上清液				
在 96 孔板中依次加入下列试剂：				
上清液	100	100	-	-
标准应用液	-	-	100	-
蒸馏水	-	-	-	100
试剂四	100	100	100	100
试剂五	25	25	25	25
充分混匀，室温静置显色 15 min				

吸光值测定：测定 412 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 标准和 A 空白，计算 ΔA 测定=A 对照-A 测定， ΔA 标准=A 标准-A 空白。注：每个样品均需设一个对照组，标准组和空白组只需要测定 1-2 次。

3.谷胱甘肽过氧化物酶（GPX）活性计算

3.1 抑制百分率的计算

$$\text{抑制百分率 (\%)} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \times 100\%$$

抑制百分率应处于 30-70% 范围内，越靠近 50% 越准确；若抑制百分率大于 70%，建议将粗酶液使用提取液适当稀释后再进行测定；抑制百分率小于 30%，建议适当增加样本量或适当延长酶促反应时间（37℃ 准确反应时间）后再进行测定，计算时相应修改。

3.2 谷胱甘肽过氧化物酶（GPX）活性计算

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织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。

$$\text{GPX (U/mg prot)} = \frac{C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测定}} \times V_{\text{酶促}} \times 10^3}{\Delta A_{\text{标准}} \times C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{200 \times \Delta A_{\text{测定}}}{C_{\text{pr}} \times \Delta A_{\text{标准}}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织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。

$$\text{GPX (U/g)} = \frac{C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测定}} \times V_{\text{酶促}} \times V_{\text{样总}} \times 10^3}{\Delta A_{\text{标准}} \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{200 \times \Delta A_{\text{测定}}}{W \times \Delta A_{\text{标准}}}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10⁴ 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。

$$\text{GPX (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测定}} \times V_{\text{酶促}} \times V_{\text{样总}} \times 10^3}{\Delta A_{\text{标准}} \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{200 \times \Delta A_{\text{测定}}}{\text{细菌或细胞数量} \times \Delta A_{\text{标准}}}$$

④按液体样本体积计算

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。

$$\text{GPX (U/mL)} = \frac{C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测定}} \times V_{\text{酶促}} \times 10^3}{\Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{200 \times \Delta A_{\text{测定}}}{\Delta A_{\text{标准}}}$$

注释： C 标：标准应用液浓度：0.08 μmol/mL；V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.02 mL；V 酶促：酶促反应体系总体积，0.25 mL；V 样总：粗酶液总体积，1 mL；C_{pr}：粗酶液蛋白浓度，mg/mL；细菌或细胞数量：以万计；W：样品质量，g；T：反应时间，5 min；10³：单位换算系数，1 μmol=1000 nmol。

四、注意事项

- ①若测定吸光值大于 1.0，建议将粗酶液使用提取液适当稀释后再进行测定，计算时相应修改；
- ②显色完成后应立即测定吸光值，以免检测时间过长影响显色造成结果误差。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

