

## 谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

GSH-Px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。GSH-Px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。

测定原理：

GSH-Px催化有机过氧化物氧化GSH，产生GSSG；谷胱甘肽还原酶（GR）催化NADPH还原GSSG，再生GSH，同时NADPH氧化生成NADP<sup>+</sup>；NADPH在340 nm有特征吸收峰，而NADP<sup>+</sup>没有；通过测定340 nm光吸收减少速率来计算GSH-Px活性。

自备仪器和用品：

低温离心机、水浴锅、可调节移液器、酶标仪、96孔板、和蒸馏水。

试剂组成和配置：

试剂一：液体120mL×1瓶，室温保存。

试剂二：粉剂×1瓶，4℃保存。

试剂三：液体10μL×1支，-20℃保存。

试剂四：液体200μL×1瓶，4℃保存。

粗酶液提取：

1. 组织：按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL试剂一）进行冰浴匀浆。8000g，4℃离心10min，取上清置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量（10<sup>4</sup>个）：试剂一体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细胞加入1mL试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率300w，超声3秒，间隔7秒，总时间3min）；然后8000g，4℃，离心10min，取上清置于冰上待测。
3. 血清等液体：直接测定。

GSH-Px测定操作：

1. 酶标仪预热30 min，调节波长到340 nm。
2. 混合试剂在25℃或者37℃（哺乳动物）水浴中预热30min。
3. 混合试剂配制：临用前，在试剂二中加入试剂一20 mL，充分震荡溶解后加入全部试剂三，混匀。（当天用完）
4. 试剂四的稀释：吸取21.5μL试剂四，加入5mL蒸馏水充分混匀，临用前配制，配制好的试剂当天使用。
5. 测定管：依次在96孔板中加入20μL上清液、160μL预热的混合试剂、20μL稀释后的试剂四，迅速混匀后于340nm处测定第30 s和第210s的吸光值，分别记为A1和A2。△A测定管= A1 - A2。

GSH-Px活性计算：

使用96孔板测定的计算公式如下

(1). 按蛋白浓度计算

GSH-Px活力单位定义：一定温度中，每mg蛋白每分钟催化1nmol NADPH氧化为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{GSH-Px (nmol/min/mg prot)} &= [\Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 1072 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2). 按样本质量计算

GSH-Px活力单位定义：一定温度中，每g样本每分钟催化1nmol NADPH氧化为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{GSH-Px (nmol/min/g 鲜重)} &= [\Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 1072 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：一定温度中，每104个细胞每分钟催化1nmol NADPH氧化为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{GSH-Px (nmol/min/104 cell)} &= [\Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109] \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 1072 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：一定温度中，每毫升液体每分钟催化1nmol NADPH氧化为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{GSH-Px (nmol/min/mL)} &= [\Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109] \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 1072 \times \Delta A \end{aligned}$$

$\varepsilon$ : NADPH摩尔消光系数 $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ;  $d$ : 96孔板光径,  $0.5 \text{ cm}$ ;  $V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积,  $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ;  $106$ :  $1 \text{ mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$ ;  $\text{Cpr}$ : 上清液蛋白浓度 (mg/mL);  $W$ : 样品质量;  $V_{\text{样}}$ : 加入反应体系中上清液体积,  $20 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-2} \text{ mL}$ ;  $V_{\text{样总}}$ : 提取液体积,  $1 \text{ mL}$ ;  $T$ : 反应时间,  $3 \text{ min}$ 。

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) 混合试剂和底物液须临用前配制，配完后置于冰上，当天使用完；
- (3) 测定过程操作须迅速；
- (4) 细胞中GSH-Px活性测定时，细胞数目须在300万-500万之间，细胞中GSH-Px的提取时可加试剂一后研磨或超声波处理，不能用细胞裂解液处理细胞。