

## M5 HiPer 谷胱甘肽过氧化物酶(GPX) 活性检测试剂盒使用说明书

Product	Unit	Cat.#
M5 HiPer 谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)活性检测试剂盒	50T/24 样	MF890-01

**【储存温度】**： 4°C保存。

**【试剂盒组分】**：

提取液：液体 40 mL×1 瓶，4°C保存；

试剂一：粉剂×1 瓶，4°C保存；临用前加入 5.5 mL 蒸馏水溶解；

试剂二：粉剂×1 瓶，4°C保存；临用前加入 6.6 mL 蒸馏水溶解备用；

试剂三：液体 20  $\mu$ L×1 支，临用前按 1 $\mu$ L 试剂三：1mL 蒸馏水的比例稀释试剂三，4°C保存。现用现配；

试剂四：液体 60 mL×1 瓶，4°C保存；瓶底若有结晶可 50°C水浴溶解，此溶液为饱和溶液，若底部还有结晶，吸取上清使用即可；

试剂五：液体 15 mL×1 瓶，4°C保存；

试剂六：液体 15 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。临用前加入 1.62 mL 蒸馏水溶解为 20 $\mu$ mol/mL 的标准溶液备用。

**【产品介绍】**：

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。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。

GPX 催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化 GSH，产生 GSSG，GSH 能与 DTNB 生成在 412 nm 处有特征吸收峰的化合物，412 nm 下吸光度的下降即可反应 GPX 的活性。

**【所需仪器和试剂】**：可见分光光度计、天平、台式离心机、1 mL 玻璃比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器、EP 管。

**【操作步骤】**：

**一、粗酶液的提取：**

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）进行冰浴匀浆。10000 rpm，4°C离心 10 min，取上清置冰上待测(如上清不清澈，再离心 3min)。

2、细菌、细胞：按照细胞数量 10<sup>4</sup> 个：提取液体积（mL）500~1000:1 的比例，建议 500 万细胞加入 1 mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300 w，超声 3 s，间隔 7 s，总时间 3 min）然后 10000rpm，4°C，离心 10 min，取上清置冰上待测(如上清不清澈，再离心 3 min)。

3、血清（浆）等液体：直接测定。

**二、GPX 测定：**

1、分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 412 nm，蒸馏水调零。

2、将 20  $\mu$ mol/mL 标准液用提取液稀释为 0.2  $\mu$ mol/mL 的标准溶液。再吸取 100  $\mu$ L 标准溶液与 400 $\mu$ L 试剂四混匀待用，此标准

液混合物的浓度为 0.04 μmol/mL。标准液混合物现用现配。

3、将 150 μL 样本与 150 μL 试剂一混合后室温放置 5 min。

4、操作表：(在 1.5mL 离心管中依次加入下列试剂)

	测定管	对照管		
样品混合物 (μL)	100	-		
试剂二 (μL)	100	100		
37℃下预热 5 min				
试剂三 (μL)	100	100		
37℃下反应 5 min				
试剂四 (mL)	1	1		
样品混合物 (μL)	-	100		
4000 rpm 常温离心 5 min, 取上清。				
试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管	空白管
蒸馏水	100	100	100	100
提取液	-	-	-	100
上清液	500	500	-	-
标准液混合物	-	-	500	-
试剂四	-	-	-	400
试剂五	200	200	200	200
试剂六	200	200	200	200

混匀后尽快测定 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  $\Delta A_{测定} = A_{对照管} - A_{测定管}$ ,  $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管}$ 。

### 三、GPX 活性计算：

#### 1、抑制百分率的计算

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

尽量使样品的抑制百分率在 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, 则需适当稀释样品; 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品。

#### 2、GPX 活性计算

(1) 按蛋白浓度计算

活力单位定义: 每 mg 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。

$$\begin{aligned} \text{GPX (U/mg prot)} &= \Delta A_{测定} \div (\Delta A_{标准} \div C_{标}) \times 1000 \times V_{酶促} \div (C_{pr} \times V_{样}) \div T \\ &= 208 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div C_{pr} \end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算

活力单位定义: 每 g 样品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。

$$\begin{aligned} \text{GPX (U/g 鲜重)} &= \Delta A_{测定} \div (\Delta A_{标准} \div C_{标}) \times 1000 \times V_{酶促} \div (V_{样} \div V_{样总} \times W) \div T \\ &= 208 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div W \end{aligned}$$

(3) 按细胞数量计算

活力单位定义: 每 10<sup>4</sup> 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。

GPX (U/104

cell)=  $\Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标}) \times 1000 \times V \text{ 酶促} \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$   
=  $208 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div \text{细胞数量}$

(4) 按液体体积计算

活力单位定义：每毫升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。

$GPX (U/mL) = \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标}) \times 1000 \times V \text{ 酶促} \div V \text{ 样} \div T = 208 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准}$

C 标：标准液混合物的浓度：0.04  $\mu\text{mol/mL}$ ；V 酶促：酶促反应体系体积，1.3 mL；V 样：样本混合物中含有的样本体积，0.05mL；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：样品质量，g；1000：换算系数，1  $\mu\text{mol} = 1000 \text{ nmol}$ 。

**【注意事项】：**

- 1、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。
- 2、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。



**Please note: All products are "FOR RESEARCH USE ONLY AND ARE NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC OR THERAPEUTIC USE"**