

谷胱甘肽过氧化物酶（GPX）活性检测试剂盒

（可见分光光度法）

产品货号：BA1115

产品规格：50管/24样

产品简介：

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_2O_2 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。

注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品内容：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体40mL×1瓶	2-8℃
试剂一	粉剂×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1瓶	2-8℃
试剂三	液体20 μ L×1支	2-8℃
试剂四	液体60mL×1瓶	2-8℃
试剂五	液体15mL×1瓶	2-8℃
试剂六	液体15mL×1瓶	2-8℃
标准品	粉剂×1支	2-8℃

溶液的配制：

1. 试剂一：临用前加入5.5mL蒸馏水溶解；
2. 试剂二：临用前加入6.6mL蒸馏水充分溶解待用；
3. 试剂三：液体置于试剂瓶内EP管中。临用前按1 μ L试剂三：1mL蒸馏水的比例稀释试剂三，现用现配；
4. 试剂四：瓶底若有结晶可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；
5. 标准品：10mg还原型谷胱甘肽。临用前加入1.62mL蒸馏水溶解为20 μ mol/mL的标准溶液备用。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、天平、台式离心机、1mL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0.05g组织，加入1mL提取液）进行冰浴匀浆。10000rpm，4℃离心10min，取上清置冰上待测（如上清不清澈，再离心3min）。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量 10^4 个：提取液体积（mL）500~1000:1的比例，建议500万细胞加入1mL提取液），冰浴超声波破碎细胞（率300w，超声3s，间隔7s，总时间3min）然后10000rpm，4℃，离心10min，取上清



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

置冰上待测(如上清不清澈,再离心3min)。

3. 血清(浆)等液体:直接测定。

二、测定步骤:

1. 分光光度计预热30min以上,调节波长至412nm,蒸馏水调零。
2. 将20 μ mol/mL标准液用提取液稀释为0.2 μ mol/mL的标准溶液。再吸取100 μ L标准溶液与400 μ L试剂四混匀待用,此标准液混合物的浓度为0.04 μ mol/mL。标准液混合物现用现配。
3. 样本混合物:将150 μ L样本与150 μ L试剂一混合后室温放置5min。
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(μ L)	100	-
试剂二(μ L)	100	100
37°C下预热5min		
试剂三(μ L)	100	100
37°C下反应5min		
试剂四(mL)	1	1
样品混合物(μ L)	-	100

4000rpm常温离心5min,取上清。

试剂名称(μ L)	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412nm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

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

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1nmol 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1nmol GSH氧化定义为一个酶活力单位。

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



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话:400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

(3) 按细胞数量计算

活力单位定义：每 10^4 个细胞在反应体系中每分钟催化 1nmol GSH氧化定义为一个酶活力单位。

$$\text{GPX (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标}}) \times 1000 \times V_{\text{酶促}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 208 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div \text{细胞数量}。$$

(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 1nmol GSH氧化定义为一个酶活力单位。

$$\text{GPX (U/mL)} = \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标}}) \times 1000 \times V_{\text{酶促}} \div V_{\text{样}} \div T = 260 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}}。$$

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， 1.3mL ；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， 1mL ；Cpr：上清液蛋白浓度（ mg/mL ）；T：反应时间， 5min ；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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com