

## Glutathione Peroxidase Assay Kit

### 谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)检测试剂盒

产品编号	产品名称	规格
BL854A	谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)检测试剂盒	48T

#### 产品简介:

谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px/GPX) 代表一种具有过氧化物酶活性的酶家族, 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, 从而保护生物免受氧化损伤。以往以过氧化氢为底物进行检测, 则会受到过氧化氢酶(Catalase)的干扰, 本试剂盒提供的有机过氧化物试剂(Cum-OOH)不会被过氧化氢酶分解, 可以特异地检测出谷胱甘肽过氧化物酶的活力。因此本试剂盒可以定量检测总谷胱甘肽过氧化物酶。

GSH 和 DTNB 反应产生黄色物质, 后者在 412nm 下有最大吸收峰, 而 GSH-Px 催化有机过氧化物试剂 (Cum-OOH)氧化 GSH, 使 GSH 量减少, GSH 量减少越多, 反应混合液黄色越浅, 则 GSH-Px 活性越大; 反之, 黄色越深, GSH-Px 活性越低。

#### 产品组成:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	4mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	2mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	40mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	20mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	4mL×1 瓶	4°C保存	若冷藏后呈固体状态, 可 25°C水浴 5min 融化即可。
标准品	粉末 ×1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

#### 使用方法:

建议正式实验前, 选取 2 个样本做预测定, 了解实验样品情况, 熟悉流程, 避免样本和试剂浪费!

##### 一、样本准备:

###### 1. 组织样本准备:

(a) 称取约 0.1g 组织 (水分充足的果实样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 在 4°C 或冰浴进行匀浆;

(b) 10000-12000g, 4°C离心 10min, 取上清液待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例提取

###### 2. 细菌/细胞样本准备:

(a) 收集细菌或细胞到离心管内, 离心弃上清;

(b) 取  $5 \times 10^6$  个细菌或细胞加入 1mL 提取液, 在 4°C 或冰浴进行匀浆;

(c) 10000-12000g, 4°C离心 10min, 取上清液待测。

【注】: 若增加样本量, 按照每  $5 \sim 10 \times 10^6$  个细菌/细胞数量加入 1mL 提取液进行提取

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.

注意: 在体外研究使用, 不用于诊断或治疗用途, 本产品不是医疗装置。



### 3. 液体样本准备:

澄清的液体直接检测; 若浑浊则离心后取上清检测。

## 二、样品测定:

1. 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 412nm, 蒸馏水调零。
2. 试剂一到五在 25°C 水浴中预热 30min。
3. 在离心管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
试剂一	80	80
样本	80	-
蒸馏水	-	80
试剂二	40	40
25°条件下反应 5min (严格控制时间)		
试剂三	800	800
10000-12000g 离心 10min, 上清液待测		

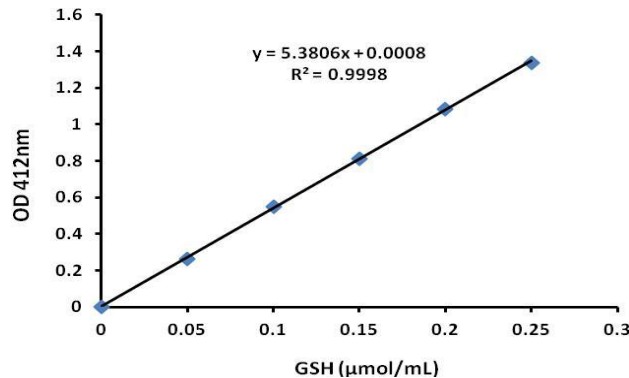
5. 显色反应: 在 1mL 玻璃比色皿中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
上述步骤的上清液	320	320
试剂四	400	400
试剂五	80	80
反应 1min, 于 412nm 波长读取吸光值 A。		

【注】: 最后一步的显色反应, 务必在 5min 之内读取吸光值。

## 三、含量计算

1. 标准曲线:  $y = 5.3806x + 0.0008$ 。x 是 GSH 摩尔浓度: μmol/mL, y 为吸光值 ΔA。



2. 按蛋白浓度计算:

活性单位定义: 在 25°C 反应条件下, 每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol GSH 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{GPx 酶活 (nmol/min/mg prot)} &= [(\Delta A - 0.0008) \div 5.3806 \times 10^3 \times V2] \div (Cpr \times V1) \div T \times D \\ &= 464.6 \times (\Delta A - 0.0008) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

【注】: 因提取液中还有蛋白质沉淀剂, 因此上清液不能用于蛋白质浓度测定。如需测定蛋白质浓度, 需另取组织测定。

3. 按样本质量计算:

活性单位定义: 在 25°C 反应条件下, 每克样本每分钟氧化 1nmol GSH 为 1 个酶活单位。

$$\text{GPx 酶活 (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A - 0.0008) \div 5.3806 \times 10^3 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D$$

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.

注意: 在体外研究使用, 不用于诊断或治疗用途, 本产品不是医疗装置。



$$=464.6 \times (\Delta A - 0.0008) \div W \times D$$

#### 4、按细菌/细胞数量计算：

酶活定义：在 25°C 反应条件下，每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟氧化 1nmol GSH 为 1 个酶活单位。

$$\text{GPx 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A - 0.0008) \div 5.3806 \times 10^3 \times V2] \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \div T \times D \\ = 464.6 \times (\Delta A - 0.0008) \div \text{细胞数量} \times D$$

#### 5、按液体体积计算：

活性单位定义：在 25°C 反应条件下，每毫升液体每分钟氧化 1nmol GSH 为 1 个酶活单位。

$$\text{GPx 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A - 0.0008) \div 5.3806 \times 10^3 \times V2] \div V1 \div T \times D \\ = 464.6 \times (\Delta A - 0.0008) \times D$$

$\Delta A = A$  空白管 - A 测定管

V1----加入反应体系中上清液体积，80 $\mu$ L = 0.08 mL

V2----反应阶段的反应总体积，1000 $\mu$ L = 1mL

T：反应时间，5min，若延长反应时间则代入计算公式重新计算

Cpr：上清液蛋白浓度（mg/mL）

V----提取液体积，1 mL

D----稀释倍数

W----样本质量，g

GSH 分子量----307.3

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（0.25 $\mu$ mol/mL）：标准品溶解在 16ml 蒸馏水里面（母液需在两天内用且-20°C保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25  $\mu$ mol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 显色反应阶段，在 1mL 玻璃比色皿中依次加入：320 $\mu$ L 标准品+400 $\mu$ L 试剂四+80 $\mu$ L 试剂五，反应 1min，于 412nm 波长读取吸光值 A，依据结果即可制作标准曲线。

#### 注意事项：

- 1、本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。
- 2、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

#### 有效期：

4°C保存三个月。

