

Glutathione Peroxidase Assay Kit

谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)检测试剂盒 微板法

产品编号	产品名称	规格
BL854B	谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)检测试剂盒 微板法	96T

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	100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	8mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	4mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	80mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	10mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	2mL×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:

(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) 12000rpm, 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:

(a) 收集细菌或细胞到离心管内, 离心弃上清;

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

(c) 12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清液待测。

【注】: 若增加样本量, 按照每 $0.5 \sim 1 \times 10^7$ 个细菌/细胞数量加入 1mL 提取液进行提取

3. 液体样本:

澄清的液体直接检测; 若浑浊则离心后取上清检测。

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。



二、样品测定:

1. 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 412nm (若无此波长, 可在 420nm 下检测)。
2. 用排枪操作, 以减小各孔间因加入试剂时间先后导致的误差。
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°C条件下反应 5min (严格控制时间)		
试剂三	800	800
12000rpm 离心 10min, 上清液待测		

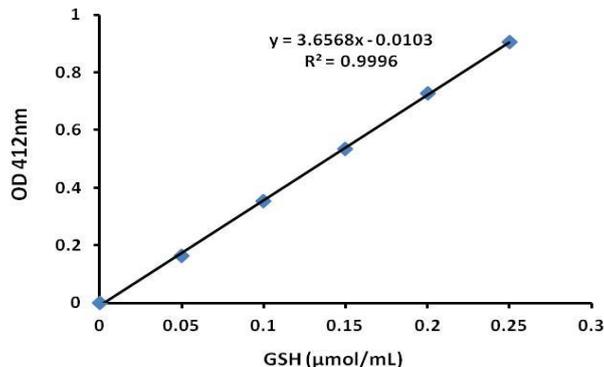
4. 显色反应: 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
上述步骤的上清液	80	80
试剂四	100	100
试剂五	20	20
反应 1min, 于 412nm 波长读取吸光值 A。		

- 【注】:** 1. 最后一步的显色反应, 务必在 5min 之内读取吸光值。若 ΔA 小于 0.01, 可增大加样量 V1 (如增至 160μL, 则试剂三相应减少, 总体积不变), 或增加第 4 步反应时间 T (如由 5min 增至 15min 或更长), 或增加样本质量 W, 则改变后的 V1 和 T 和 W 需要代入公式重新计算。
2. 若 A 测定值小于 0.1 或 ΔA 大于 0.65, 可减少 V1 (如减至 20μL, 则增加相应体积蒸馏水, 总体积不变), 或对样本用蒸馏水稀释后测定, 则改变后的 V1 和稀释倍数 D 需要代入公式重新计算。

三、含量计算

1. 标准曲线: $y = 3.6568x - 0.0103$ 。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。

$$\begin{aligned} \text{GPx 酶活 (nmol/min/mg prot)} &= [(\Delta A + 0.0103) \div 3.6568 \times 10^3 \times V2] \div (Cpr \times V1) \div T \times D \\ &= 683.7 \times (\Delta A + 0.0103) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{GPx 酶活 (nmol/min/g 鲜重)} &= [(\Delta A + 0.0103) \div 3.6568 \times 10^3 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 683.7 \times (\Delta A + 0.0103) \div W \times D \end{aligned}$$

4. 按细菌/细胞数量计算:

酶活定义: 在 25°C 反应条件下, 每 10⁴ 个细胞每分钟氧化 1nmol GSH 为 1 个酶活单位。

$$\text{GPx 酶活 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0103) \div 3.6568 \times 10^3 \times V2] \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \div T \times D$$

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。



$$=683.7 \times (\Delta A + 0.0103) \div \text{细胞数量} \times D$$

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。

$$\text{GPx 酶活}(\text{nmol} / \text{min} / \text{mL}) = [(\Delta A + 0.0103) \div 3.6568 \times 10^3 \times V2] \div V1 \div T \times D \\ = 683.7 \times (\Delta A + 0.0103) \times D$$

$\Delta A = A$ 空白管 - A 测定管

V1----加入反应体系中上清液体积, 80 μ L = 0.08 mL

V2----反应阶段的反应总体积, 1000 μ 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

细胞数量, 万---500

附: 标准曲线制作过程:

1. 制备标准品母液 (25 μ mol/mL): 标准品溶解在 1.6mL 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 μ 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 96 孔板中依次加入: 80 μ L 标准品 + 100 μ L 试剂四 + 20 μ 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 保存六个月。

