

谷胱甘肽过氧化物酶（GPX）检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1025

保存：-20℃避光保存 12 个月

规格：48T/48S 96T/96S

适用样本：血清（浆）、动植物组织、细胞、细菌

产品简介

谷胱甘肽过氧化物酶（GPX）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。GPX不仅能够特异地催化还原型谷胱甘肽与活性氧（ROS）反应，生成氧化型谷胱甘肽 GSSG，从而保护生物膜免受 ROS 的损害，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。GPX 的活性中心是硒半胱氨酸，硒是 GPX 的必需部分，测定 GPX 的活力可以作为衡量机体硒水平的一项生化指标。本试剂盒提供了一种简单的检测方法，用于检测生物样本，如血清（浆）、动植物组织、细胞、细菌样本中 GPX 的活性。GPX 催化 H₂O₂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⁺；NADPH 在 340nm 有特征吸收峰，而 NADP⁺没有；通过测定 340nm 光吸收减少速率来计算 GPX 活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
试剂一	60mL	120mL	4℃保存
试剂二	1	2	-20℃避光保存
试剂三	1	2	4℃避光保存
试剂四	100 μ L	200 μ L	4℃避光保存

自备耗材

酶标仪或紫外分光光度计（能测 340 nm 处的吸光度）
 96 孔 UV 微孔板或微量石英比色皿、可调节式移液枪及枪头
 恒温箱、制冰机、低温离心机
 去离子水
 匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。
 工作液配制：临用前，取试剂二一瓶，加入试剂一 10mL，充分溶解后，取少量混合液于一瓶试剂三中，充分混匀后再转移回试剂二中，混匀待用。（当天用完）
 试剂四：使用前吸取试剂四 21.5 μ L 加入 5mL 去离子水，充分混匀，临用前配制，配制好的试剂当天使用；4℃避光保存。

样本制备

动植物组织：称取 0.1g 组织样本，加入 1mL 预冷的试剂一，快速冰上匀浆。匀浆后的样本，8,000g, 4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

产品说明书

细胞或细菌：收集 500 万细胞或细菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞或细菌，离心后弃上清，加入 1mL 预冷的试剂一，冰浴超声波破碎细胞或细菌 5min（功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），然后 8,000g，4℃ 离心 10min，取上清液，置冰上待测。

血清（浆）：直接测定（如需要可用生理盐水稀释不同倍数）。

注意：

1. 推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月，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，匀浆液避免反复冻融。
2. 细胞中 GPX 活性测定时，细胞数目须在 $3 \sim 5 \times 10^6$ 之间，细胞中 GPX 的提取时可加试剂一后匀浆或超声波处理，不能用细胞裂解液处理细胞。
3. 如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 法蛋白质定量试剂盒，进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 340nm，紫外分光光度计去离子水调零。
2. 工作液和稀释后的试剂四置于 25℃（普通物种）或者 37℃（哺乳动物）中预热 30min 以上。
3. 样本测定：在 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中依次加入 20 μL 样本，160 μL 工作液，20 μL 稀释后的试剂四，迅速混匀，于 340nm 处测定 30s 和 210s 吸光度，记为 A_1 和 A_2 ，计算 $\Delta A = A_1 - A_2$

注意：

1. 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 ΔA 小于 0.001 可适当加大样本量。如果 ΔA 大于 0.5，样本可用试剂一进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量。
2. 测定反应的温度对测定结果有影响，请控制在 25℃（一般物种）或者 37℃（哺乳动物）。
3. 因通过反应速率计算酶活，使用 96 孔 UV 板时请根据操作速度控制一次测定的样本数（通常一次测定 4-8 个样本）。

结果计算

A. 使用 96 孔 UV 微孔板测定的计算公式如下：

(1) 按蛋白浓度计算

GPX 活力单位定义：一定温度中，每毫克蛋白在反应体系中每分钟催化 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$GPX(\text{U/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T = 1072 \times \Delta A \div Cpr$$

(2) 按样本鲜重计算

GPX 活力单位定义：一定温度中，每克样品在反应体系中每分钟催化 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$GPX(\text{U/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 1072 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细胞数量计算

GPX 活力单位定义：一定温度中，每 10^4 个细胞在反应体系中每分钟催化 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$GPX(\text{U}/10^4 \text{ Cells}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1072 \times \Delta A \div 500 = 2.144 \times \Delta A$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：一定温度中，每毫升液体样本在反应体系中每分钟催化 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$GPX(\text{U/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 1072 \times \Delta A$$

ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d: 96 孔板光径，0.5cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积， $200 \mu \text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$; 10^9 : $1 \text{ mol} = 1 \times 10^9 \text{ nmol}$; Cpr: 上清液蛋白浓度 mg/mL; W: 样品质量，0.1g; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积， $20 \mu \text{L} = 0.02 \text{ mL}$; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积，1mL; T: 反应时间，3min; 500: 细胞数量，500 万。

B. 使用微量石英比色皿进行测定的计算公式

将上述计算公式中光径 d: 0.5cm 调整为 d: 1cm 进行计算即可。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

产品说明书

相关产品：

- PMK1023 还原型谷胱甘肽（GSH）检测试剂盒（微量法）
- PMK1024 氧化型谷胱甘肽（GSSG）检测试剂盒（微量法）
- PMK1027 谷胱甘肽 S-转移酶（GST）检测试剂盒（微量法）
- PMK1022 谷胱甘肽还原酶（GR）检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

