

谷胱甘肽过氧化物酶（GPX） 检测试剂盒（分光法）

货号：PMK1025BKS

规格：25 管/24S 50 管/48S

检测方法：比色法

储存条件：-20℃避光保存 12 个月

建议正式实验前，选取 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验，如果样本吸光值不在检测范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

一、产品简介

研究背景：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。

检测原理：本试剂盒提供了一种简单的检测方法，用于检测生物样本中 GPX 的活性。其原理是：GPX 催化 H_2O_2 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。

检测意义：评估机体抗氧化能力、筛查硒缺乏、监测氧化应激相关疾病的进程。

适用样本：血清（浆）、动物组织、细胞、细菌。

二、产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	25 管	50 管	
试剂一	80mL	80mL×2 瓶	4℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃避光保存
试剂三	25μL	25μL×2	4℃避光保存
试剂四	100μL	200μL	4℃避光保存

三、需自备的仪器和用品

紫外分光光度计（能测 340nm 处的吸光度）、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）

四、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 50mL，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：使用前按吸取试剂四 21.5μL 加入 5mL 去离子水的比例，充分混匀，临用前配制，配制好的试剂当天使用；4℃避光保存。

五、样本制备

动物组织：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。

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 $3\sim5\times10^6$ 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。

六、实验步骤

1.紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 340nm，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：在石英比色皿中依次加入 200μL 样本，1600μL 工作液，200μL 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 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

该反应体系是按照常规的容量 3mL 左右的比色皿设计的，如果比色皿最适合的加样体积不是 2mL 左右，可以根据实际需要的体积按比例调整。

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 1.0，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）。

七、结果计算

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。

$$\text{GPX(U/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}} \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 536 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{GPX (U/g 鲜重)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}} \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 536 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{GPX(U/10}^4\text{ Cells)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}} \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 536 \times \Delta A \div 500 = 1.072 \times \Delta A$$

4.按液体体积计算

GPX 活力单位定义：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。

$$\text{GPX(U/mL)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 536 \times \Delta A$$

ϵ : NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1cm ; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $2\text{mL} = 2 \times 10^{-3} \text{ L}$; 10^9 : $1\text{mol} = 1 \times 10^9 \text{ nmol}$; C_{pr} : 上清液蛋白浓度 mg/mL ; W : 样品质量, g ; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积, $200\mu\text{L} = 0.2\text{mL}$; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1mL ; T : 反应时间, 3min ; 500 : 细胞数量, 500 万 。

附录：常见问题与解决方案 (FAQ)

问题	解决措施
计算时如果选择合适的计算公式？	动物组织及细胞微生物等，可以用质量或者细胞数量计算，也可以建议测蛋白浓度
	植物可建议用质量计算，也可以建议测蛋白
	血液或是其他液态样品，可建议用体积计算
	如客户要购买蛋白含量测定试剂盒，除了说明书强调用考马斯亮蓝法的，通常建议 BCA 法。动植物组织因为蛋白含量高，在 10mg/ml 左右，如果用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度的话通常需要用 PBS 缓冲液等稀释液进行稀释。
测定时如何进行调零？	除说明书中提示用对照管或某种试剂调零外，都用纯水调零。
试剂盒中样本提取时需要 0.1g 组织，我的样品量不够怎么办？	通常可以按比例缩小，如说明书中是约 0.1g 组织加 1ml 提取液，可以等比例缩小，如 0.05g 组织加 0.5ml 提取液提取。后续操作不变。
	对于数量少的样品，一方面可以减少提取液体积，另一方面还可以延长反应时间。

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安全规定进行实验，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。

相关产品：

PMK1023BKS 还原型谷胱甘肽 (GSH) 检测试剂盒 (分光法)

PMK1024BKS 氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 检测试剂盒 (分光法)

PMK1022BKS 谷胱甘肽还原酶 (GR) 检测试剂盒 (分光法)

更多产品详情了解，请关注公众号：

