

谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)测试盒

(货号: A005-2-1 微板法 96T)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 预试后再进行批量实验, 否则由此导致的后果用户自行承担!

一、测定原理

谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)可以促进过氧化氢(H₂O₂)与还原型谷胱甘肽(GSH)反应生成H₂O及氧化型谷胱甘肽(GSSG), 谷胱甘肽过氧化物酶的活力可用其酶促反应的速度来表示, 测定此酶促反应中还原型谷胱甘肽的消耗, 则可求出酶的活力。

GSH量的测定: GSH和二硫代二硝基苯甲酸作用生成5-硫代二硝基苯甲酸阴离子呈现较稳定的黄色, 在412nm处测其吸光度即可计算出GSH的量。

二、试剂盒组成与试剂配制: (试剂盒有效期6个月)

试剂	名称	规格	保存
试剂一	底物贮备液	0.1mL×1瓶	4℃
	使用前取部分底物贮备液按1:99的比例加蒸馏水稀释, 配成应用液, 现配现用。		
试剂二	终止剂	液体40mL×1瓶	4℃
试剂三	缓冲液	20mL×1瓶	4℃
试剂四	显色剂	液体5.5mL×1瓶	4℃避光
试剂五	促进剂	液体1mL×1支	4℃
试剂六	GSH标准品	粉剂3.07mg×2支	4℃
	1μmol/mL标准液配制: 测定前将1支标准品粉剂加10mL蒸馏水, 充分溶解配成, 配好后4℃可保存2周。		
	20nmol/mL标准液配制: 取1μmol/mL标准液20μL加试剂二980μL(或是按1:49比例配)充分混匀配成, 现用现配。		

注: 试剂五低温或长时间保存可能有结晶出现, 需将其37℃融化后再用。

三、所需仪器及试剂:

酶标仪(412nm)及96孔板(附送一块), 涡旋混匀器, 离心机, 37℃水浴锅或恒温箱, 试管或离心管, 蒸馏水, 生理盐水, 蛋白测定试剂(组织或细胞用, 本公司有售)。

四、血清(浆)样本测定方法:

1、样本前处理: 直接使用(先挑选2例样品进行做预试, 确定最佳取样浓度(A_{对照}-A_{测定}差值在0.1~0.2之间为宜)), 若有固体物存在, 可4000rpm离心5分钟后, 取上清检测。

2、操作步骤:

第1步(酶促反应): (可在离心管中操作)

	测定管	对照管
血清(浆)(μL)	10	10
1μmol/mL标准液(μL)	20	20
试剂一应用液(μL)	10	10
(反应条件)	37℃准确反应5分钟	不反应, 直接加试剂二
试剂二(μL)	200	200

涡旋混匀, 4000rpm, 离心10min, 取上清在孔板中作显色反应(此上清若是不完全澄清透亮, 可每管再加入50μL三氯甲烷(分析纯), 涡旋混匀30~60秒后再离心取上清作显色反应)。

第2步显色反应: (在96孔板中操作)

	空白孔	标准孔	测定孔	对照孔
试剂二(μL)	100			
20nmol/mL标准液(μL)		100		
酶促反应上清液(μL)			100	100
试剂三(μL)	100	100	100	100
试剂四(μL)	25	25	25	25

轻轻振荡孔板混匀, 室温静置5分钟, 波长412nm, 酶标仪读取各孔吸光值A。

3、活力定义: 每毫升血清在37℃每分钟催化1nmol GSH反应为一个酶活力单位(U)。

计算公式:

$$\text{血清(浆)GSH-PX活力(U/mL)} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{V_{\text{酶促}}}{V_{\text{样}}} \div T \times N$$

C_{标准}: 显色反应中标准液浓度, 20nmol/mL;

V_{酶促}: 酶促反应体系总体积, 240μL;

V_样: 样本取样量, 10μL;

T: 反应时间, 5min;

N: 样本测试前稀释倍数。

五、组织、细胞及全血等样本测定方法:

1、样本先处理:

动物组织: 称取待测动物组织的重量, 按重量(g): 体积(mL)=1:9的比例, 加入9倍体积的生理盐水, 低温(0~4℃)条件匀浆, 4000rpm, 离心10min, 取上清液待测(匀浆上清液需要测定其蛋白浓度, 蛋白测定试剂盒本公司有售)。

植物组织: 取组织, 用蒸馏水清洗表面污渍后, 用吸水纸吸干, 然后用液氮研磨成粉状, 称取植物粉末重量约100mg, 加入900μL(或是按100mg:400μL的比例加)生理盐水(或PBS), 低温研磨或匀浆, 4000rpm, 离心10min, 取上清液待测;

细胞样本前处理: (贴壁细胞)用细胞刮配合等渗PBS刮下或用胰酶消化下来(消化后加入0.5-1mL等渗PBS冲洗), 再将细胞悬液转移到另一离心管中, 1000转/分, 离心10分钟, 弃上清液, 留细胞沉淀; 用等渗PBS再清洗1~2次, 同样1000转/分, 离心10分钟, 弃上清液, 留细胞沉淀(若不立即测定, 可直接放-20℃或-80℃冰箱保存, 3个月内可用); 往细胞沉淀中加入0.2~0.3mL的生理盐水(加完后轻轻混匀细胞溶液, 使其均匀, 可吸取少量进行细胞计数; 若是破碎后可以测蛋白, 则不用细胞计数), 冰水浴条件下超声破碎(功率:200~300W, 3~5秒/次, 间隔15秒, 重复运行3~5min)或手动匀浆, 制备好的匀浆液若比较均匀可不离心直接测定。也可采用裂解液裂解(推荐TritonX-100, 1~2%浓度0.1mL, 冰上裂解30~40分钟), 裂解好的液体可不离心直接测定。[注]: 建议细胞数在100万个以上(越多测定效果越好)。破碎好的液体可显微镜观察细胞是否破碎完全。

全血或红细胞: ①、取肝素抗凝全血(或积压红细胞)20μL, 加蒸馏水至1mL, 充分混匀, 配成1:49的溶血液, 放置5分钟直至溶血液对光呈完全透明状, 方可进行检测。(已配好的溶血液中GSH-PX活力只能保持45~60分钟, 天冷时可延迟至120分钟。如果当天来不及测定则以抗凝全血冰箱(4℃~8℃)保存, 2~3天内酶活力变化不大)。

其它液体样本: 直接使用, 若有固体物存在, 则4000rpm离心5min后取上清检测;

线粒体制备及前处理: 取10%的组织匀浆5~10mL, 以1000~2000rpm离心10分钟(用普通离心机或低温低速离心机), 取上清液以8000~10000rpm(低温高速离心机)离心15分钟, 沉淀物为线粒体(若不立即测定, 可直接放-20℃或-80℃冰箱保存, 3个月内可用)。往线粒体中加入0.2~0.3mL的生理盐水, 冰水浴条件下超声破碎(功率:300W, 3~5秒/次, 间隔30秒, 重复运行3~

5min), 制备好的匀浆液若比较均匀可不离心直接测定。也可采用裂解液裂解(推荐 TritonX-100, 1~2%浓度 0.1mL, 冰上裂解 30~40 分钟), 裂解好的液体可不离心直接测定 (制备好的匀浆液需要测定其蛋白浓度, 蛋白测定试剂盒本公司有售)。

注: 以上样本前处理好后, 需先挑选 2 例预期差异较大的样本进行预试 (如将匀浆上清按 1:4、1:9、1:19 或 1:39 的比例稀释), 选取 $A_{\text{对照}}$ 减去 $A_{\text{测定}}$ 差值在 0.1~0.2 之间对应的样本稀释倍数来做正式实验。

2、操作步骤:

第 1 步 (酶促反应): (可在离心管中操作)

	测定管	对照管
待测样本 (μL)	10	10
1mmol/L 标准液 (μL)	20	20
试剂五 (μL)	5	5
试剂一应用液 (μL)	10	10
(反应条件)	37°C 准确反应 5 分钟	不反应, 直接加试剂二
试剂二 (μL)	195	195

涡旋混匀, 4000rpm, 离心 10min, 取上清在孔板中作显色反应 (此上清若是不完全澄清透亮, 可每管再加入 50μL 三氯甲烷 (分析纯), 涡旋混匀 30~60 秒后再离心取上清作显色反应)

第 2 步显色反应: (在 96 孔板中操作)

	空白孔	标准孔	测定孔	对照孔
试剂二 (μL)	100			
20μmol/L 标准液 (μL)		100		
酶促反应上清液 (μL)			100	100
试剂三 (μL)	100	100	100	100
试剂四 (μL)	25	25	25	25

轻轻振荡孔板混匀, 室温静置 5 分钟, 波长 412nm, 酶标仪读取各孔吸光值 A。

3、计算方法:

①动物组织 (或细胞) 样本活力定义: 每毫克蛋白对应的组织在 37°C 每分钟催化 1mmol GSH 反应为一个酶活力单位 (U)。

计算公式:

$$\text{动物组织 GSH - PX 活力 (U/mg 蛋白)} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{V_{\text{酶促}}}{V_{\text{样}}} \div T \times N \div \text{Cpr}$$

②植物组织样本活力定义: 每克组织 37°C 每分钟催化 1mmol GSH 反应为一个酶活力单位 (U)。

计算公式:

$$\text{植物 GSH - PX 活力 (U/g 组织)} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{V_{\text{酶促}}}{V_{\text{样}}} \div T \times N \div \frac{W}{V_{\text{样总}}}$$

③细胞样本按细胞数计算活力定义: 每 1 万个细胞 37°C 每分钟催化 1mmol GSH 反应为一个酶活力单位 (U)。

计算公式:

$$\text{细胞 GSH - PX 活力 (U/10}^4\text{ 细胞)} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{V_{\text{酶促}}}{V_{\text{样}}} \div T \times N \div \frac{\text{细胞总数}}{V_{\text{样总}}}$$

④全血 (或红细胞) 及其它液体样本活力定义: 每毫升全血 (或红细胞或其它液体) 在 37°C 每分钟催化 1mmol GSH 反应为一个酶活力单位 (U)。

计算公式:

$$\text{全血 GSH - PX 活力 (U/mL)} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{V_{\text{酶促}}}{V_{\text{样}}} \div T \times N$$

以上公式中:

C_{标准}: 显色反应中标准液浓度, 20nmol/mL;

V_{酶促}: 酶促反应体系总体积, 240μL;

V_样: 样本取样量, 10μL;

T: 反应时间, 5min;

N: 样本测试前稀释倍数;

Cpr: 组织 (或细胞) 匀浆上清蛋白浓度, mg/mL;

V_{样总}: 样本前处理时加入的匀浆介质总体积, mL;

细胞总数: 细胞样本在破碎时的总数量, 10⁴ 个。

六、计算举例:

例 1: 取大鼠血清用生理盐水 5 倍稀释后进行测定, 测得空白孔吸光值为 0.055, 标准孔吸光值为 0.171, 对照孔吸光值为 0.452, 测定孔吸光值为 0.264。则计算结果为:

$$\text{大鼠血清 GSH - PX 活力 (U/mL)} = \frac{0.452 - 0.264}{0.171 - 0.055} \times 20 \times \frac{240}{10} \div 5 \times 5 = 777.93 \text{U/mL}$$

例 2: 取鸡肝脏组织制备匀浆上清后, 再用生理盐水 5 倍稀释后进行测定, 测得对照孔吸光值为 0.446, 测定孔吸光值为 0.261, 标准孔吸光值为 0.171, 空白孔吸光值为 0.055, 同时测得匀浆上清蛋白浓度为 8.96mg/mL。则计算结果为:

$$\text{鸡肝 GSH - PX 活力 (U/mg 蛋白)} = \frac{0.446 - 0.261}{0.171 - 0.055} \times 20 \times \frac{240}{10} \div 5 \times 5 \div 8.96 = 85.44 \text{U/mg 蛋白}$$

例 3: 取人全血用蒸馏水 1:49 混合制备成溶血液进行测定, 测得对照孔吸光值为 0.486, 测定孔吸光值为 0.305, 标准孔吸光值为 0.171, 空白孔吸光值为 0.055。则计算为:

$$\text{人全血 GSH - PX 活力 (U/mL)} = \frac{0.486 - 0.305}{0.171 - 0.055} \times 20 \times \frac{240}{10} \div 5 \times 50 = 7489.66 \text{U/mL}$$

七、注意点

- 1、测试前请一定要预试, 以防样本酶活力过高或过低造成影响。
- 2、空白孔、标准孔一批实验只需做 1—2 个孔。测定管和对照管每个样本都要做。
- 3、酶促反应后, 离心得到的上清若是不完全澄清透亮, 可每管再加入 50μL 三氯甲烷 (分析纯), 涡旋混匀 30~60 秒后再离心取上清作显色反应。
- 4、有的样本测定孔吸光值和对照孔吸光值接近, 此为样本 GPX 活性较低缘故 (且计算结果误差会比较大), 这种情况可考虑增加样本浓度或样本量以及延长酶促反应时间来改善测试效果。
- 5、样本匀浆上清液当天提取, 当天测试。组织蛋白质的测定法有多种, 可购买本公司蛋白定量试剂盒。
- 6、测溶血液中 GPX 活性要注意样品测试前红细胞一定要充分溶血。(以对光观察透亮为标准, 若不透亮可以冻溶一次, 但有部分大鼠及猪的红细胞是不可冻溶冻越冻越不破, 最好先取 1~2 只样本做预试)。

八、测定意义

谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GSH-PX) 是机体内广泛存在的一种重要的催化过氧化氢分解的酶。它特有的催化还原型谷胱甘肽 (GSH) 对过氧化氢的还原反应, 可以起到保护细胞膜结构和功能完整的作用。GSH-PX 的活性中心是硒半胱氨酸, 硒是 GSH-PX 的必需部分, 每分子酶含 4 原子硒。测定 GSH-PX 的活力可以作为衡量机体硒水平的一项生化指标。