

谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)测试盒说明书

(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 40 mL×1 瓶	4℃
试剂三	缓冲液	液体 20 mL×1 瓶	4℃
试剂四	显色剂	液体 5.5 mL×1 瓶	4℃避光
试剂五	促进剂	液体 1 mL×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)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 5min, 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)	混匀, 37℃准确反应 5 分钟后进行下面操作	
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:

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、样本前处理:

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 10min 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 15min, 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
1μmol/mL 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)	混匀, 37℃ 准确反应 5 分钟后进行下面操作	混匀后, 不反应直接进行下面操作
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			
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、计算方法:

①动物组织(或细胞)样本按蛋白计算:

活力定义: 每毫克蛋白对应的样本在 37℃ 每分钟催化 1nmol GSH 反应为一个酶活力单位 (U)。

计算公式:

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

②植物组织样本按样本重量计算:

活力定义: 每克组织 37℃ 每分钟催化 1nmol 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℃ 每分钟催化 1nmol 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)及其它液体样本计算:

活力定义: 每毫升全血(或红细胞或其它液体)在 37℃ 每分钟催化 1nmol GSH 反应为一个酶活力单位 (U)。

计算公式:

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

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(不包含匀浆过程);

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。

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 37℃ 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。它特异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。