谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

GSH-Px 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。GSH-Px 不仅能够特异地催化还原型谷胱甘肽与 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。

测定原理：

GSH-Px 催化有机过氧化物氧化 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 340 nm 有特征吸收峰，而 $NADP^+$没有；通过测定 340 nm 光吸收减少速率来计算 GSH-Px 活性。

自备仪器和用品：

低温离心机、水浴锅、可调节移液器、酶标仪、96 孔板、和蒸馏水。

试剂组成和配置：

试剂一：液体 120mL×1 瓶，室温保存。

试剂二：粉剂×2 瓶，4℃保存。

试剂三：液体 5μL×2 支，-20℃保存。

试剂四：液体 200μL×1 瓶，4℃保存。

粗酶液提取：

1. 组织：按照组织质量（g）：试剂一体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）进行冰浴匀浆。8000g，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量（10^4 个）：试剂一体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 8000g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。
3. 血清等液体：直接测定。

GSH-Px 测定操作：

1. 酶标仪预热 30 min，调节波长到 340 nm。
2. 混合试剂在 25℃或者 37℃（哺乳动物）水浴中预热 30min。
3. 混合试剂配制：临用前，取试剂二一瓶，加入试剂一 10 mL，充分震荡溶解后，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）
4. 试剂四的稀释：吸取 21.5μL 试剂四，加入 5mL 蒸馏水充分混匀，临用前配制，配制好的试剂当天使用。
5. **测定管：**依次在 96 孔板中加入 20μL 上清液、160μL 预热的混合试剂、20μL 稀释后的试剂四，迅速混匀后于 340nm 处测定第 30 s 和第 210s 的吸光值，分别记为 A1 和 A2。△A 测定管= A1 - A2。

GSH-Px 活性计算：

使用 96 孔板测定的计算公式如下

(1). 按蛋白浓度计算

GSH-Px 活力单位定义：一定温度中，每 mg 蛋白每分钟催化 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

GSH-Px (nmol/min/mg prot)=[△A÷ε÷d×V 反总×10^9]÷（Cpr×V 样）÷T

=1072×△A÷Cpr

(2). 按样本质量计算

GSH-Px 活力单位定义：一定温度中，每 g 样本每分钟催化 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

GSH-Px (nmol/min/g 鲜重)=[△A÷ε÷d×V 反总×10^9]÷(W×V 样÷V 样总)÷T

=1072×△A÷W

（3）按细胞数量计算

活性单位定义：一定温度中，每 10^4 个细胞每分钟催化 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

GSH-Px (nmol/min/10^4 cell)= [△A÷ε÷d×V 反总×10^9]÷(细胞数量×V 样÷V 样总)÷T

=1072×△A÷细胞数量

（4）按液体体积计算

活性单位定义：一定温度中，每毫升液体每分钟催化 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

GSH-Px (nmol/min/mL)=[△A÷ε÷d×V 反总×10^9]÷V 样÷T

=1072×△A

ε：NADPH 摩尔消光系数 6.22×10^3L/mol/cm；d：96 孔板光径，0.5 cm；V 反总：反应体系总体积，200μL=2×10^{-4} L；10^6：1 mol=1×10^6μmol； Cpr：上清液蛋白浓度（mg/mL）；W ：样品质量；V 样：加入反应体系中上清液体积，20μL =2×10^{-2} mL；V 样总：提取液体积，1 mL；T：反应时间，3 min。

注意事项：

（1）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；

（2）混合试剂和底物液须临用前配制，配完后置于冰上，当天使用完；

（3）测定过程操作须迅速；

（4）细胞中 GSH-Px 活性测定时，细胞数目须在 300 万-500 万之间，细胞中 GSH-Px 的提取时可加试剂一后研磨或超声波处理，不能用细胞裂解液处理细胞。