

谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 说明书

分光光度法 50 管/48 样

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：

紫外分光光度计、低温离心机、水浴锅、可调节移液器、1mL 石英比色皿和蒸馏水。

试剂组成和配置：

试剂一：液体 100mL×1 瓶，室温保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃保存。

试剂三：液体 20μL×1 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 (10⁴ 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。

测定操作：

1. 分光光度计预热 30 min，调节波长到 340 nm，蒸馏水调零。
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，在试剂二中加入试剂一 40 mL，充分震荡溶解后加入全部试剂三，混匀。(注意：必须现配现用，当天使用完)
4. 试剂四的稀释：吸取 21.5μL 试剂四，加入 5mL 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 1mL 石英比色皿中加入 100μL 上清液、800μL 预热的混合试剂、100μL 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， $\Delta A = A1 - A2$ 。

计算公式:

(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。

$$\text{GSH-Px (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T$$

$$= 536 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{GSH-Px (nmol/min/g)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (\text{W} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$

$$= 536 \times \Delta A \div \text{W}$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义: 一定温度中, 每 10⁴ 个细胞每分钟催化 1nmol NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

$$\text{GSH-Px (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$

$$= 536 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

(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。

$$\text{GSH-Px (nmol/min/mL)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T$$

$$= 536 \times \Delta A$$

ϵ : NADPH 摩尔消光系数 $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; V 反总: 反应体系总体积, $1000 \mu\text{L} = 0.001 \text{ L}$; 10^6 : $1 \text{ mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; Cpr: 上清液蛋白浓度 (mg/mL); V 样: 加入反应体系中上清液体积, $100 \mu\text{L} = 0.1 \text{ mL}$; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; W, 样本质量, g; 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。