

谷胱甘肽过氧化物酶（DTNB 法）说明书

分光光度法 50 管/24 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；GSH 与 DTNB 反应产生黄色化合物，在 412nm 有吸收峰；通过测定 412nm 光吸收减少速率来计算 GSH-Px 活性。

自备仪器和用品：

分光光度计、低温离心机、水浴锅、可调节移液器、1mL 玻璃比色皿和蒸馏水。

试剂组成和配置：

试剂一：液体 60mL×1 瓶，室温保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃保存。

试剂三：液体 100μL×1 瓶，4℃保存。

试剂四：液体 50mL×1 瓶，4℃保存。

试剂五：液体 40 mL×1 瓶，4℃保存。

试剂六：液体 3mL×1 管，4℃避光保存。

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。

测定操作：

1. 分光光度计预热 30 min，调节波长到 412nm，蒸馏水调零。
2. 试剂二的配制：临用前，在试剂二中加入试剂一 10 mL，充分震荡溶解，在 25℃（非哺乳动物）或者 37℃（哺乳动物）水浴中预热 30min。用不完的试剂 4℃保存。
3. 试剂三的稀释：吸取 21.5μL 试剂三，加入 5mL 水充分混匀，临用前配制，配制好的试剂当天使用。
5. 在 EP 管中加入如下试剂

试剂名称	测定管	对照管
样本	40	40
试剂二	140	140
试剂三	20	
蒸馏水		20
混匀，准确反应 10min		
试剂四	800	800

立即混匀，取反应液待测。

6. 在 96 孔板中加入如下试剂

试剂名称	测定管	对照管
反应液	200	200
试剂五	750	750
试剂六	50	50

混匀，25°C静置 10min，测定 412nm 吸光值。ΔA=A 测定-A 对照。每个测定管设一个对照管。

计算公式：

标准曲线：y = 3.6222 x - 0.0037，R² = 1，x 为标品浓度，单位 μmol/mL，y 为吸光度 ΔA。

(1) 按样本重量计算

单位定义：每 g 样本每分钟催化 1 μmol GSH 氧化为一个酶活单位。

$$\text{GPX 活性 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = (\Delta A + 0.0037) \div 3.6222 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 0.69 \times (\Delta A + 0.0037) \div W$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 蛋白每分钟催化 1 μmol GSH 氧化为一个酶活单位。

$$\text{GPX 活性 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A + 0.0037) \div 3.6222 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ = 0.69 \times (\Delta A + 0.0037) \div C_{\text{pr}}$$

(3) 按液体体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟催化 1 μmol GSH 氧化为一个酶活单位。

$$\text{GPX 活性 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = (\Delta A + 0.0037) \div 3.6222 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ = 0.69 \times (\Delta A + 0.0037)$$

(4) 按细菌或细胞密度计算

单位定义：每一万个细胞每分钟催化 1 μmol GSH 氧化为一个酶活单位。

$$\text{GPX 活性 } (\mu\text{mol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A + 0.0037) \div 3.6222 \times V_{\text{反总}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 0.69 \times (\Delta A + 0.0037) \div \text{细胞数量}$$

V 反总，反应总体积，1mL；V 样，加入样本体积，0.04mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；

W：样品质量，g；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；T，反应时间，10min。

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) 加入试剂四后如果产生沉淀，可能是由于样品中蛋白质含量过高，可以 10000g 离心 5min 后取上清测定；
- (3) 测定过程操作须迅速。