

谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px/GPX）活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC1195

规格：100T/48S、200T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	100T 规格	200T 规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	液体 120 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 120 μL×1 支	液体 240 μL×1 支	2-8℃保存
试剂三	液体 25 mL×1 瓶	液体 50 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 12 mL×1 瓶	液体 24 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	液体 5 mL×1 瓶	液体 6 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	粉剂×1 支	2-8℃保存
试剂一溶解液	液体 2.5 mL×1 瓶	液体 5 mL×1 瓶	2-8℃保存

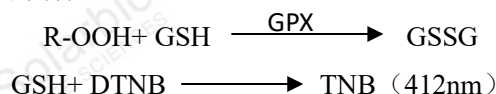
溶液的配制：

- 1、**100T 试剂一：**试剂放于试剂瓶内玻璃瓶中。临用前加入 2.2mL 试剂一溶解液溶解，2-8℃可保存 4 周；
- 2、**200T 试剂一：**试剂放于试剂瓶内玻璃瓶中。临用前加入 4.4mL 试剂一溶解液溶解，2-8℃可保存 4 周；
- 3、**试剂二工作液：**临用前将试剂二液体离心至管底部（掌上离心机甩离即可），根据样本数量按照试剂二：蒸馏水=10μL：90μL（100μL，10T）的比例进行配制，现用现配；
- 4、**试剂三：**瓶底若有结晶可 50℃水浴溶解，此溶液为饱和溶液，若底部最终还有结晶，吸取上清使用即可；
- 5、**试剂四：**若试剂有析出可 50℃加热溶解，也可震荡促进溶解；
- 6、**标准品：**10 mg 还原型谷胱甘肽。临用前加入 0.405 mL 蒸馏水溶解为 80 μmol/mL 的标准品备用，2-8℃可保存 4 周。

产品说明：

谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione peroxidase, GSH-Px 或 GPX, EC.1.11.1.9）是机体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解酶。GPX 根据酶活性中心的不同可分为两类，一类以硒代半胱氨酸为活性中心，一类以半胱氨酸为活性中心，前者存在于大部分生物体内。GPX 可以清除生物体内产生的过氧化氢、脂质过氧化物等，减轻氧化产物对机体的毒害作用，是生物体内抗氧化系统的重要组成部分。**本试剂盒检测的是以硒代半胱氨酸为活性中心的 GPX 活性。**

GPX 催化有机过氧化物氧化 GSH，产生 GSSG，GSH 能与 DTNB 生成在 412nm 处有特征吸收峰的化合物，412nm 下吸光度的下降即可反应 GPX 的活性。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。





需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、天平、台式离心机、微量玻璃比色皿/96 孔板、可调式移液枪、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、EP 管、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

- 1、组织：按照组织质量（g）:提取液体积(mL)为 1:5~10 的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆。5000 rpm，4℃离心 10 min，取上清置冰上待测（如上清不清澈可以离心更长时间）。
- 2、细菌/细胞：按照细菌/细胞数量（10⁴ 个）:提取液体积（mL）500~1000:1 的比例（建议 500 万细菌/细胞加入 1 mL 提取液），冰浴超声波破碎细菌/细胞（功率 300w，超声 3s，间隔 7s，总时间 3 min）然后 5000 rpm，4℃，离心 10min，取上清置冰上待测（如上清不清澈可以离心更长时间）。
- 3、血清（浆）等液体：直接测定。若有浑浊可离心后取上清测定。

二、测定步骤

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 412 nm，分光光度计蒸馏水调零。
- 2、将 80 μmol/mL 标准品用蒸馏水稀释为 0.1 μmol/mL 的标准品，现用现配。（可取 10μL 80 μmol/mL 标准品和 790μL 蒸馏水混合配成 1μmol/mL 的标准品，再取 100μL 1μmol/mL 的标准品和 900μL 蒸馏水混合配成 0.1μmol/mL 的标准品备用）
- 3、临用前试剂一（根据样本量）、试剂二工作液 37℃预热 5min。
- 4、操作表:

（1）酶促反应（1.5 mL 离心管中依次加入下列试剂）:

试剂名称（μL）	测定管	对照管
样本	20	-
试剂一	20	20
试剂二工作液	10	10
37℃下反应 5min		
试剂三	200	200
样本	-	20
充分混匀，4000 rpm 常温离心 10min，各管取 100μL 上清于 EP 管或者 96 孔板中进行下述显色反应。		

（2）显色反应:

试剂名称(μL)	测定管	对照管	标准管	空白管
上清液	100	100	-	-
标准品	-	-	100	-
蒸馏水	-	-	-	100
试剂四	100	100	100	100
试剂五	25	25	25	25
充分混匀，常温静置 15 min，412 nm 下的吸光度，分别记为 A 测定管、A 对照管、A 标准管、A 空白管。计算 ΔA 测定=A 对照管-A 测定管，ΔA 标准=A 标准管-A 空白管。空白管和标准管仅需做 1-2 次。每个测定管需设置一个对照管。				



三、GPX 活性计算

(1) 按蛋白浓度计算

活性单位定义：每 mg 蛋白在反应体系中每分钟催化 1 nmol GSH 氧化定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\text{GPX 活性 (U/mg prot)} &= \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标}}) \times 1000 \times V_{\text{酶促}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times F \\ &= 250 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \times F\end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：每 g 样本在反应体系中每分钟催化 1 nmol GSH 氧化定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\text{GPX 活性 (U/g 质量)} &= \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标}}) \times 1000 \times V_{\text{酶促}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \times F \\ &= 250 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F\end{aligned}$$

(3) 按细胞/细菌数量计算

活性单位定义：每 10⁴ 个细胞/细菌在反应体系中每分钟催化 1 nmol GSH 氧化定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\text{GPX 活性 (U/10}^4\text{ cell)} &= \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标}}) \times 1000 \times V_{\text{酶促}} \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times F \\ &= 250 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div N \times F\end{aligned}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：每 mL 液体在反应体系中每分钟催化 1 nmol GSH 氧化定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\text{GPX 活性 (U/mL)} &= \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标}}) \times 1000 \times V_{\text{酶促}} \div V_{\text{样}} \div T \times F \\ &= 250 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F\end{aligned}$$

C 标：标准品浓度：0.1 μmol/mL；V 酶促：酶促反应体系体积，0.25 mL；V 样：酶促反应中加入样本体积，0.02 mL；V 样总：提取液体积，1 mL；C_{pr}：上清液蛋白浓度，mg/mL；T：反应时间，5 min；N：细胞数量，以万计；W：样本质量，g；1000：换算系数，1 μmol=1000 nmol；F：样本稀释倍数。

注意事项：

- 1、ΔA 测定大于 0.5（96 孔板）或者 ΔA 测定大于 0.7（微量比色皿）时，建议将样本用提取液稀释后进行测定。
- 2、建议一次不要做过多样本以免检测时间过长影响显色，使测定不准确。
- 3、预实验建议样本匀浆液梯度稀释，查找最佳稀释倍数再进行后续实验。

实验实例：

1. 取 0.102 g 鸡肝脏组织加入 1 mL 提取液进行匀浆研磨，取上清稀释 5 倍后再按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算 ΔA 测定=A 对照管-A 测定管=0.694-0.31=0.384，ΔA 标准=A 标准管-A 空白管=0.558-0.065=0.493，按样本质量计算酶活得：
GPX 活性 (U/g 质量)=250×ΔA 测定÷ΔA 标准÷W×5（稀释倍数）=9.545×10³ U/g 质量。
2. 取 0.105 g 娃娃菜叶片加入 1 mL 提取液进行匀浆研磨，取上清按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算 ΔA 测定=A 对照管-A 测定管=0.652-0.578=0.074，ΔA 标准=A 标准管-A 空白管=0.558-0.065=0.493，按样本质量计算酶活得：
GPX 活性 (U/g 质量)=250×ΔA 测定÷ΔA 标准÷W=357.38 U/g 质量。
3. 取大鼠血清稀释 8 倍后进行测定，用 96 孔板测得计算 ΔA 测定=A 对照管-A 测定管=0.642-0.405=0.237，ΔA 标准=A 标准管-A 空白管=0.558-0.065=0.493，按液体体积计算酶活得：
GPX 活性 (U/mL)=250×ΔA 测定÷ΔA 标准×8（稀释倍数）=961.46 U/mL





参考文献:

- [1] Liang Y, Chen YX, Zhao LN. et al. Effect of Sodium Selenate on Glutathione Peroxidase Activity of Different Triticeae Crops [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2017, 30(7): 1511-1515.
- [2] Yang JX, Ren JP, Xu Y. et al. Study on Glutathione Peroxidase Activity in Seedling Stage of Several Gramineous Crops [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2018, (5): 1-3+5.
- [3] Liu X, Pietsch KE, Sturla SJ. Susceptibility of the antioxidant selenoenzymes thioredoxin reductase and glutathione peroxidase to alkylation-mediated inhibition by anticancer acylfulvenes [J]. Chemical Research in Toxicology, 2011, 24(5): 726-736.

相关系列产品:

- BC1170/BC1175 还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量检测试剂盒
- BC1180/BC1185 氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 含量检测试剂盒
- BC1150/BC1155 硫氧还蛋白氧化还原酶 (TrxR) 活性检测试剂盒
- BC1210/BC1215 γ -谷氨酰半胱氨酸连接酶 (GCL) 活性检测试剂盒
- BC6260/BC6265 谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 活性检测试剂盒
- BC6270/BC6275 总谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px/GPX) 活性检测试剂盒

