

谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px/GPX）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

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：BC1190

规格：50T/24S

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	规格	保存条件
提取液	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 0.3mL×1 支	2-8℃保存
试剂三	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	液体 10mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存
试剂一溶解液	液体 7 mL×1 瓶	2-8℃保存

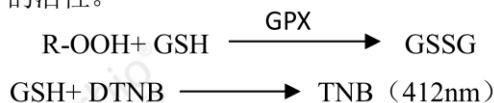
溶液的配制：

- 1、试剂一：试剂放于试剂瓶内玻璃瓶中。临用前加入 6.6mL 试剂一溶解液溶解，2-8℃可保存 4 周；
- 2、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，2T）的比例进行配制，现用现配；
- 3、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；
- 4、试剂四：若试剂有析出可 50℃加热溶解，也可震荡促进溶解；
- 5、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、天平、台式离心机、1 mL 玻璃比色皿、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 **0.05 g 组织**, 加入 1 mL 提取液) 进行冰浴匀浆。5000 rpm, 4°C 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 (10^4 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°C, 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、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 412nm, 蒸馏水调零。
- 2、将 80 $\mu\text{mol/mL}$ 标准品用蒸馏水稀释为 0.1 $\mu\text{mol/mL}$ 的标准品, 现用现配。(可取 10 μL 80 $\mu\text{mol/mL}$ 标准品和 790 μL 蒸馏水混合配成 1 $\mu\text{mol/mL}$ 的标准品, 再取 100 μL 1 $\mu\text{mol/mL}$ 的标准品和 900 μL 蒸馏水混合配成 0.1 $\mu\text{mol/mL}$ 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°C 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	100	-
试剂一	100	100
试剂二工作液	50	50
37°C 下反应 5min		
试剂三	1000	1000
样本	-	100
充分混匀, 4000 rpm 常温离心 10 min, 各管取 500 μL 上清于新的 1.5mL EP 管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	500	500	-	-
标准品	-	-	500	-
蒸馏水	-	-	-	500
试剂四	500	500	500	500
试剂五	125	125	125	125
充分混匀, 常温静置 15 min。测定 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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{对照管}} - A_{\text{测定管}}$, $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。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。

$$\begin{aligned}\text{GPX 活性 (U/mg prot)} &= \Delta A \text{ 测定} \div (\Delta A \text{ 标准} \div C \text{ 标}) \times 1000 \times V \text{ 酶促} \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T \times F \\ &= 250 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div Cpr \times F\end{aligned}$$

(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 1nmol 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，1.25 mL；V 样：酶促反应中加入的样本体积，0.1 mL；V 样总：提取液体积，1 mL；Cpr：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 0.7，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 1mL 玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定=A 对照管-A 测定管=0.92-0.429=0.491，ΔA 标准=A 标准管-A 空白管=0.688-0.026=0.662，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）=9.089×10³ 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 1mL 玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定=A 对照管-A 测定管=0.873-0.782=0.091，ΔA 标准=A 标准管-A 空白管=0.688-0.026=0.662，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=327.29 U/g 质量。
3. 取大鼠血清稀释 4 倍后进行测定，用 1mL 玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定=A 对照管-A 测定管=0.879-0.315=0.564，ΔA 标准=A 标准管-A 空白管=0.688-0.026=0.662，按液体体积计算酶活得：
GPX 活性(U/mL)=250×ΔA 测定÷ΔA 标准×4（稀释倍数）=851.96 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

