

谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）试剂盒说明书

（货号：ADS-W-G003-196 微板法 196 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

谷胱甘肽过氧化物酶（GPx, EC 1.11.1.9）代表一种具有过氧化物酶活性的酶家族，在保护生物免受氧化损伤中起重要作用。以往以过氧化氢为底物进行检测，则会受到分解过氧化氢的过氧化氢酶(Catalase)的干扰，本试剂盒提供的有机过氧化物试剂(Cum-OOH)不会被过氧化氢酶分解，因而可以特异地检测出谷胱甘肽过氧化物酶的活力。因此本试剂盒可以定量检测总谷胱甘肽过氧化物酶。

GSH 和 DTNB 反应产生黄色物质，后者在 412nm 下有最大吸收峰，而 GSH-Px 催化有机过氧化物试剂(Cum-OOH)氧化 GSH，使 GSH 量减少，GSH 量减少越多，反应混合液黄色越浅，则 GSH-Px 活性越大；反之，黄色越深，GSH-Px 活性越低。

二、试剂盒组分与配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	200mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	16mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	8mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	160mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	20 mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	4mL×1 瓶	4℃避光保存	1. 若冷藏后呈固体，可 25℃水浴 5min 融化即可； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉体 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议正式实验前选 2 个样本做预测定，了解样品情况和熟悉实验流程，避免样本和试剂浪费！

1、样本提取：

- ① 组织样本：称取约 0.1g 组织（水分充足样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液，在 4℃ 或冰浴匀浆(或使用各类常见电动匀浆器)。4℃ 约 12,000rpm 离心 10min，取上清待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量(g)：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取。

- ② 细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，在 4℃ 或冰浴进行匀浆(或使用各类常见电动匀浆器)。4℃ 约 12,000rpm 离心 10min，取上清待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量(10^4)：提取液(mL)为 500~1000：1 的比例进行提取。

- ③ 液体样本：直接测定。若浑浊，离心后取上清检测。

2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30 min，调节波长到 412 nm（若无此波长，可在 420nm 下检测）。
- ② 用排枪操作，以减小各孔间因加入试剂时间先后导致的误差。
- ③ 试剂一到五在 25℃水浴中预热 30min，在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	空白管
试剂一	80	80
样本	80	
蒸馏水		80
试剂二	40	40
25°C条件下反应 5min(严格控制时间)		
试剂三	800	800
若有沉淀, 需 12000rpm 室温离心 10min, 上清液待测。		

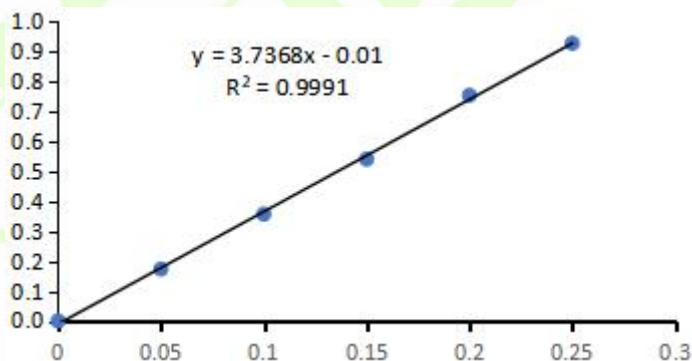
④显色反应：在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	空白管
上述步骤的上清液	80	80
试剂四	100	100
试剂五	20	20
反应 2min 后, 于 412nm 波长读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{空白管}} - A_{\text{测定管}}$ 。		

【注】：1. 最后一步的显色反应，务必在 5min 之内读取吸光值。若 ΔA 小于 0.01，可增大加样量 V1（如增至 160μL，则试剂三相应减少，总体积不变），或增加第③步反应时间 T（如由 5min 增至 15min 或更长），或增加样本质量 W。则改变后的 V1 和 T 和 W 需要代入公式重新计算。
2. 若 A 测定值小于 0.1 或 ΔA 大于 0.65，可减少 V1（如减至 20μL，则增加相应体积蒸馏水，保持总体积不变）或对样本用蒸馏水稀释后测定，则改变后的 V1 和稀释倍数 D 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线：y = 3.7368x - 0.01。x 是 GSH 摩尔浓度：μmol/mL，y 为吸光值 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算：

酶活定义：在 25°C 反应条件下，每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol GSH 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{GPx 酶活}(\text{nmol/min/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.01) \div 3.7368 \times 10^3 \times V_2] \div (C_{\text{pr}} \times V_1) \div T \times D \\ &= 669 \times (\Delta A + 0.01) \div C_{\text{pr}} \times D \end{aligned}$$

3、按样本质量计算：

酶活定义：在 25°C 反应条件下，每克样本每分钟氧化 1nmol GSH 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{GPx 酶活}(\text{nmol/min/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.01) \div 3.7368 \times 10^3 \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \div T \times D \\ &= 669 \times (\Delta A + 0.01) \div W \times D \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算：

酶活定义：在 25°C 反应条件下，每 10⁴ 个细胞每分钟氧化 1nmol GSH 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{GPx 酶活}(\text{nmol/min/10}^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.01) \div 3.7368 \times 10^3 \times V_2] \div (500 \times V_1 \div V) \div T \times D \\ &= 669 \times (\Delta A + 0.01) \div 500 \times D \end{aligned}$$

5、按液体体积计算：

活性单位定义：在 25°C 反应条件下，每毫升液体每分钟氧化 1nmol GSH 为 1 个酶活单位。

$$\text{GPx 酶活}(\text{nmol/min/mL}) = [(\Delta A + 0.01) \div 3.7368 \times 10^3 \times V_2] \div V_1 \div T \times D = 669 \times (\Delta A + 0.01) \times D$$

V---提取液体积, 1 mL; V1---加入反应体系中上清液体积, 80μL =0.08 mL;
V2---反应阶段的反应总体积, 1000μL=1mL; D---稀释倍数, 未稀释即为 1;
W---样本质量, g; GSH 分子量---307.3; T---反应时间, 5min; 500---细菌/细胞数量, 万;
Cpr---上清液蛋白浓度 (mg/mL); 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

1 用前使粉体落入底部, 再加 1.6mL 蒸馏水溶解 (-20℃保存两天), 标准品母液浓度为 2.5μmol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 μmol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下:

吸取标准品母液 100uL, 加入 900uL 蒸馏水, 混匀得到 0.25μmol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μmol/mL	0	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据加样表操作, 根据结果, 以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值, 过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	80	
蒸馏水		80
试剂四	100	100
试剂五	20	20
反应 2min 后于 412nm 波长读取 A, $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		