

## 谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）试剂盒说明书

（微板法 96 样）

## 一、产品简介：

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：

| 试剂名称 | 规格        | 保存要求 | 备注                         |
|------|-----------|------|----------------------------|
| 提取液  | 100mL×1 瓶 | 4℃保存 |                            |
| 试剂一  | 8mL×1 瓶   | 4℃保存 |                            |
| 试剂二  | 4mL×1 瓶   | 4℃保存 |                            |
| 试剂三  | 80mL×1 瓶  | 4℃保存 |                            |
| 试剂四  | 10 mL×1 瓶 | 4℃保存 |                            |
| 试剂五  | 2mL×1 瓶   | 4℃保存 | 若冷藏后呈固体，可 25℃水浴 5min 融化即可。 |
| 标准品  | 粉体 mg×1 支 | 4℃保存 | 若重新做标曲，则用到该试剂。             |

## 三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、低温离心机、移液器、研钵、冰和蒸馏水。

## 四、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）活性测定：

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、样本制备：

- 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、上机检测：

- 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：

| 试剂名称（ $\mu$ L）        | 测定管 | 空白管（仅做一次） |
|-----------------------|-----|-----------|
| 试剂一                   | 80  | 80        |
| 样本                    | 80  |           |
| 蒸馏水                   |     | 80        |
| 试剂二                   | 40  | 40        |
| 25℃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：

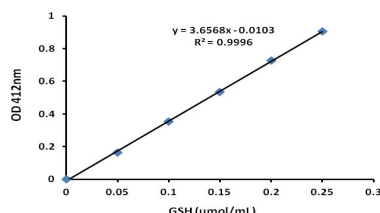
|                                                                             |     |            |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----|------------|
| 试剂名称 (μL)                                                                   | 测定管 | 空白管 (仅做一次) |
| 上述步骤的上清液                                                                    | 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  $\Delta A$  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  $\Delta A$  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 = 3.6568x - 0.0103。x 是 GSH 摩尔浓度：μmol/mL，y 为吸光值  $\Delta A$ 。



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。

$$\text{GPx 酶活 (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0103) \div 3.6568 \times 10^3 \times V2] \div (Cpr \times V1) \div T \times D \\ = 683.7 \times (\Delta A + 0.0103) \div Cpr \times D$$

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。

$$\text{GPx 酶活 (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0103) \div 3.6568 \times 10^3 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ = 683.7 \times (\Delta A + 0.0103) \div W \times D$$

4、按细胞数量计算：

酶活定义：在 25°C 反应条件下，每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟氧化 1nmol GSH 为 1 个酶活单位。

$$\text{GPx 酶活 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0103) \div 3.6568 \times 10^3 \times V2] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ = 683.7 \times (\Delta A + 0.0103) \div 500 \times D$$

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。

$$\text{GPx 酶活 (nmol/min/mL)} = [(\Delta A + 0.0103) \div 3.6568 \times 10^3 \times V2] \div V1 \div T \times D = 683.7 \times (\Delta A + 0.0103) \times D$$

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 制备标准品母液 (25μmol/mL)：用前使粉体落入底部，再加 1.6mL 蒸馏水溶解 (-20°C 保存两天)。

2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度：0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 μmol/mL。

3 显色反应阶段，在 96 孔板中依次加入：80μL 标准品+100μL 试剂四+20μL 试剂五，反应 2min 后，于 412nm 波长读取吸光值 A，依据结果即可制作标准曲线。