Beijing Solarbio Science & Technology Co., Ltd
Tel: 400-968-6088
Fax: 010-56371281
Http://www.solarbio.com

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

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 60 mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	粉剂×2 瓶	4℃保存
试剂二	液体 10 μL×1 瓶	4℃保存
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4℃保存
试剂四	液体 15 mL×1 瓶	4℃保存
试剂五	液体 5mL×1 瓶	4℃保存
标准品	粉剂×1 支	4℃保存
稀释液	液体 20 mL×1 瓶	4℃保存

溶液的配制：

1、 试剂一：临用前加入 3.3 mL 稀释液，充分溶解；

2、 试剂二：临用前按 2 μL 试剂二：10 mL 蒸馏水的比例稀释试剂二，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、 标准品：10 mg 还原型谷胱甘肽。临用前加入 0.405 mL 稀释液溶解为 80 μmol/mL 的标准溶液备用。

产品说明：

谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione peroxidase, GSH-Px 或 GPX）是机体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解酶。GPX 能够催化还原型谷胱甘肽（GSH）生成氧化型谷胱甘肽（GSSG），使有毒的过氧化氢还原成无毒的羟基化合物。

GPX 催化 H_2O_2 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。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

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、EP 管。

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℃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：按照细胞数量 10^4 个：提取液体积（mL）500~1000:1 的比例（建议 500 万细胞加入 1 mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（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。

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，蒸馏水调零。

2、 将 80 μmol/mL 标准液用稀释液稀释为 0.08 μmol/mL 的标准溶液，现用现配。

3、 操作表：(在 1.5 mL 离心管中依次加入下列试剂)

	测定管	对照管
样本上清液（μL）	20	-
试剂一（μL）	20	20
37℃下预热 5min		
试剂二（μL）	10	10
37℃下反应 5min		
试剂三（μL）	200	200
样本上清液（μL）	-	20

充分混匀，4000 rpm 常温离心 5 min，取上清于 EP 管或者 96 孔板中。

试剂名称(μL)	测定管	对照管	标准管	空白管
稀释液	-	-	-	100
上清液	100	100	-	-
标准液	-	-	100	-
试剂四	100	100	100	100
试剂五	25	25	25	25

充分混匀，室温静置 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 ΔA 测定=A 对照管-A 测定管，ΔA 标准=A 标准管-A 空白管。

三、GPX 活性计算

1、 抑制百分率的计算

抑制百分率=(A 对照管-A 测定管) ÷（A 对照管-A 空白管）× 100%

尽量使样本的抑制百分率在 30-70%范围内，越靠近 50%越准确。如果计算出来的抑制百分率小于 30%或大于 70%，则通常需要调整加样量后重新测定。如果测定出来的抑制百分率偏高，则需适当稀释样本；如果测定出来的抑制百分率偏低，则需重新准备浓度比较高的待测样本。

2、 GPX 活性计算

（1）按蛋白浓度计算

活力单位定义：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力单位。

GPX (U/mg prot) =ΔA 测定÷（ΔA 标准÷C 标）×1000×V 酶促÷（Cpr×V 样）÷T

=200×ΔA 测定÷ΔA 标准÷Cpr

（2）按样本质量计算

活力单位定义：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力单位。

GPX (U/g 质量)= ΔA 测定÷（ΔA 标准÷C 标）×1000×V 酶促÷(V 样÷V 样总×W)÷T

=200×ΔA 测定÷ΔA 标准÷W

（3）按细胞数量计算

活力单位定义：每 10^4 个细胞在反应体系中每分钟催化 1 nmol GSH 氧化定义为一个酶活力单位。

GPX (U/10^4 cell)=ΔA 测定÷（ΔA 标准÷C 标）×1000×V 酶促÷（细胞数量×V 样÷V 样总）÷T

=200×ΔA 测定÷ΔA 标准÷细胞数量

（4）按液体体积计算

活力单位定义：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力单位。

GPX (U/mL)= ΔA 测定÷（ΔA 标准÷C 标）×1000×V 酶促÷V 样÷T=200×ΔA 测定÷ΔA 标准

C 标：标准液混合物的浓度：0.08 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；Cpr：上清液蛋白浓度，mg/mL；T：反应时间，5 min；细胞数量：以万计；W：样本质量，g；1000：换算系数，1 μmol=1000 nmol。

注意事项：

1、 吸光度若大于 1.5 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。

实验实例：

1. 取 0.1 g 小鼠肝脏组织加入 1 mL 提取液进行匀浆研磨，取上清稀释 40 倍后再按照测定步骤操作，用 96 孔板测得 A 测定管=0.152，A 对照管=0.278，A 标准管=0.370，A 空白管=0.064，计算ΔA 测定=A 对照管-A 测定管=0.126，ΔA 标准=A 标准管-A 空白管=0.306，按样本质量计算酶活得：

   GPX (U/g 质量)=200×ΔA 测定÷ΔA 标准÷W×40（稀释倍数）=32941 U/g 质量。

2. 取 0.1 g 杨树叶片加入 1 mL 提取液进行匀浆研磨，用 96 孔板测得 A 测定管=0.199，A 对照管=0.259，A 标准管=0.370，A 空白管=0.064，计算ΔA 测定=A 对照管-A 测定管=0.060，ΔA 标准=A 标准管-A 空白管=0.306，按样本质量计算酶活得：

   GPX (U/g 质量)=200×ΔA 测定÷ΔA 标准÷W=392 U/g 质量。

相关发表文献：

[1] Yang Yang,Li Jing,Wei Cong,et al. Amelioration of nonalcoholic fatty liver disease by swertiamarin in fructose-fed mice. Phytomedicine. June 2019; 59.(IF4.18)

[2] Xuejuan Xia,Yuxiao,Xing,Guannan Li,et al. Antioxidant activity of whole grain Qingke (Tibetan Hordeum vulgare L) toward oxidative stress in d-galactose induced mouse model. Journal of Functional Foods. June 2018;(IF3.197)

[3] Qilong Wang, Guosheng Xiao, Guoliang Chen,et al. Toxic effect of microcystin-LR on blood vessel development. Toxicological & Environmental Chemistry. Feb 2019;(IF3.547)

[4] Wang H, Li Y Y, Qiu L Y, et al. Involvement of DJ-1 in ischemic preconditioning-induced delayed cardioprotection in vivo[J]. Molecular medicine reports, 2017, 15(2): 995-1001

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