谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）试剂盒说明书

（分光法 48 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	60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	4mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	2mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	40mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	20 mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	4 mL×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：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、低温离心机、移液器、研钵。

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 4ºC 或冰浴匀浆(或使用各类常见电动匀浆器)。4ºC×12000rpm 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 4ºC 或冰浴进行匀浆(或使用各类常见电动匀浆器)。4ºC 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 可见分光光度计预热 30 min，调节波长到 412 nm，蒸馏水调零。

② 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（μL）	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

12000rpm 离心 10min,上清液待测。

④ 显色反应：在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

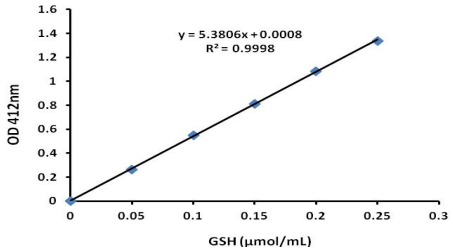
试剂名称（μL）	测定管	空白管（仅做一次）
上述步骤的上清液	320	320
试剂四	400	400
试剂五	80	80
反应 2min 后，于 412nm 处读吸光值 A，△A= A 空白管-A 测定管。		

【注】：1.最后一步的显色反应，务必在 5min 之内读取吸光值。若ΔA 在零附近，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△A 大于 1，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 = 5.3806x + 0.0008。x 是 GSH 摩尔浓度：μmol/mL，y 为吸光值ΔA 。



2、按蛋白浓度计算：

活性单位定义：在 25ºC 反应条件下，每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol GSH 为 1 个酶活单位。

GPx(nmol/min/mg prot)=[(△A-0.0008)÷5.3806×10^3×V2] ÷(Cpr×V1)÷T×D

= 464.6×(△A-0.0008)÷Cpr×D

3、按样本质量计算：

活性单位定义：在 25ºC 反应条件下，每克样本每分钟氧化 1nmol GSH 为 1 个酶活单位。

GPx(nmol/min/g 鲜重)=[(△A-0.0008)÷5.3806×10^3×V2]÷(W×V1÷V)÷T×D

=464.6×(△A-0.0008)÷W×D

4、按细胞数量计算：

酶活定义：在 25ºC 反应条件下，每 10^4 个细胞每分钟氧化 1nmol GSH 为 1 个酶活单位。

GPx(nmol/min/10^4 cell)=[(△A-0.0008)÷5.3806×10^3×V2]÷(500×V1÷V)÷T×D

=464.6×(△A-0.0008)÷500×D

5、按液体体积计算：

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

GPx(nmol/min/mL)=[(△A-0.0008)÷5.3806×10^3×V2]÷V1÷T×D=464.6×(△A-0.0008)×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℃保存两天）。

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

3 显色反应阶段，在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：320μL 标准品+400μL 试剂四+80μL 试剂五，反应 2min 后于 412nm 波长读取 A，依据结果制作标准曲线。