

谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)测试盒

(货号: A005-1)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

【测定原理】

谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)可以促进过氧化氢(H₂O₂)与还原型谷胱甘肽(GSH)反应生成 H₂O 及氧化型谷胱甘肽 (GSSG), 谷胱甘肽过氧化物酶的活力可用其酶促反应的速度来表示, 测定此酶促反应中还原型谷胱甘肽的消耗, 则可求出酶的活力。

反应方程式为:
$$H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{GSH-PX} 2H_2O + GSSG$$

GSH-PX 的活力以催化 GSH 的反应速度来表示, 由于这二个底物在没有酶的条件下, 也能进行氧化还原反应 (称非酶促反应), 所以最后计算此酶活力时必须扣除非酶促反应所引起的 GSH 减少的部分。

GSH 量的测定: GSH 和二硫代二硝基苯甲酸作用生成 5-硫代二硝基苯甲酸阴离子呈现较稳定的黄色, 在 412nm 处测其吸光度即可计算出 GSH 的量。

【试剂盒有效期和保存条件】

本试剂盒保存期: 6 个月; 贮存温度: 4℃。

【试剂组成和配制】

试剂编号	名称	50管/24样 (A005-1-1)	100管/48样 (A005-1-2)	保存条件
试剂一	底物贮备液	1mL×1瓶	2mL×1瓶	4℃
试剂一应用液的配制：用时取 0.1mL 加蒸馏水至 10mL，也就等于是 100 倍稀释配成应用液，现用现配，也可按比例需多少配多少。				
试剂二	甲粉	1瓶	1瓶	4℃
	乙液	25mL×1瓶	50mL×1瓶	4℃
	应用液配制	每瓶甲粉加蒸馏水 88mL，高温加热至沸腾溶解，稍冷后再加入 1 瓶乙液	每瓶甲粉加蒸馏水 175mL，加热至沸腾溶解，稍冷后再加入 1 瓶乙液	室温
试剂三	粉剂	1瓶	1瓶	4℃
		每瓶加蒸馏水 100mL 溶解	每瓶加蒸馏水 200mL 溶解	
试剂四	显色剂	液体 25 mL×1 瓶	粉剂×1 支，用时加蒸馏水 50mL 溶解	4℃避光
试剂五	粉剂	2支	4支	4℃避光
	试剂五应用液的配制：每支加蒸馏水 10mL 溶解；4℃避光可保存五天。			
试剂六	标准品溶剂贮备液	5mL×1瓶	10mL×1瓶	4℃
	标准品稀释液配制：按贮备液：蒸馏水=1：9 的比例混合配成，4℃保存			

试剂七	GSH 标准品	粉剂 3.07mg×2 支	粉剂 3.07mg×4 支	4℃
	1mmol/L GSH 标准液 配制:测定前将 1 支 GSH 标准品粉剂加 10mL 标准品稀释液(测血清(浆)样本时可用蒸馏水来配制该标准品粉剂),充分溶解配成,配好后可 4℃保存 2 周。			
	100μmol/LGSH 标准液 配制:取 1mmol/LGSH 标准液 1mL 加标准品稀释液 9mL 配成,做标准曲线用,若不做标准曲线可以不配。			
	20μmol/L GSH 标准液 配制:取 1mmol/LGSH 溶液 0.1 mL 加标准品稀释液 4.9mL(或是按 1:49 比例配)充分混匀配成,现用现配。			

注:试剂二甲液配置时,最好用能直接加热的设备(如电炉、酒精灯之类,但要注意使用安全)加热,不要用水浴锅隔水加热(水浴可能无法使其溶解);试剂二应用液配好后为过饱和溶液,室温静置冷却后,如有结晶,则取上清进行实验即可;试剂三溶解时也可以放在 37℃环境中加速溶解。

【所需仪器及试剂】

可见光分光光度计及 1cm 光径比色皿(或酶标仪(412nm)及 96 孔板),涡旋混匀器,离心机, 37℃ 水浴锅或恒温箱, 电炉, 试管或离心管, 蒸馏水, 生理盐水, 蛋白测定试剂(组织或细胞用, 本公司有售)。

【实验注意点】

注 1: 空白管、标准管一般只需做 1—2 只。酶管和非酶管每个样本都要做。

注 2: 最佳取样浓度因样品种类不同, 其 GSH-PX 活力不一, 根据酶的百分抑制率与酶的活力呈抛物线关系, 各种测定样品取样浓度不一样, 在每测定一种新的样品前最好先做预试来选择一个最佳取样浓度。

最佳取样浓度的摸索: 当您第一次使用本试剂盒测试某一种新的样品时最好挑选 2 例样本先做三只不同倍数的稀释。例如: 测全血时用蒸馏水 1:24、1:49、1:99 稀释的溶血液按操作表进行实验; 测组织匀浆时则取 5%、2%、1% 等的匀浆进行实验 (动物肝脏中酶活一般较高); 测血清时取未稀释的血清及用生理盐水 1:1、1:4、1:9、1:19 稀释的血清进行实验, 然后进行计算抑制率: $(\text{非酶管吸光} - \text{酶管吸光}) \div \text{非酶管吸光} \times 100\%$, 结果需在 15%~55% 之间, 然后取百分抑制率在 45% 或 50% 左右的一管作为最佳取样浓度, 因为酶的百分抑制率与酶的活力呈抛物线关系, 若百分抑制率大于 60% 时, 则需将样品浓度稀释后再测试。若百分抑制率小于 15% 时, 则需将样品浓度加大后测试。(需要注意的是组织匀浆或其他类似样本有时本身浊度或颜色有干扰时, 预实验不必通过抑制率计算, 这时可以用非酶管吸光值减去酶管吸光值在 0.2 左右来选择) 这样做对科研结果分析及检验有很大帮助; 若百分抑制率大于 60% 或小于 10%, 各个测定组的结果在检验中有可能无显著性差异。

【测定意义】

谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GSH-PX) 是机体内广泛存在的一种重要的催化过氧化氢分解的酶。它特异的催化还原型谷胱甘肽 (GSH) 对过氧

化氢的还原反应，可以起到保护细胞膜结构和功能完整的作用。GSH-PX 的活性中心是硒半胱氨酸，硒是 GSH-PX 的必需部分，每分子酶含 4 原子硒。测定 GSH-PX 的活力可以作为衡量机体硒水平的一项生化指标。

血清（浆）中 GSH-PX 活力的测定

一、血清（浆）GSH-PX 测定操作方法：（分两步反应）

（1）、酶促反应：（试剂一应用液提前 5min 在 37℃ 预温）

	非酶管	酶 管
1mmol/L GSH 标准液(mL)	0.2	0.2
待测血清（浆）(mL)		0.1
37℃ 预温 5 分钟		
试剂一应用液 (mL)	0.1	0.1
37℃ 准确反应 5 分钟		
试剂二应用液 (mL)	2	2
待测血清（浆）(mL)	0.1	
混匀，3500~4000 转/分，离心 10 分钟，取上清 1mL 作显色反应		

（2）、显色反应：

	空白管	标准管	非酶管	酶管
标准品稀释液 (mL)	1.0			
20 μ mol/L GSH 标准液 (mL)		1.0		
上清液 (mL)			1.0	1.0
试剂三应用液 (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0
试剂四应用液 (mL)	0.25	0.25	0.25	0.25
试剂五应用液 (mL)	0.05	0.05	0.05	0.05

混匀，室温静置 15 分钟，412nm 处，1cm 光径，蒸馏水调零，分光光度计测各管吸光值 A（或是每管吸出 200 μ L 反应液，加到 96 孔板中，酶标仪 412nm 处读数）

二、血清中 GSH-PX 酶活力的计算：

定义：每毫升血清在 37 $^{\circ}$ C 每分钟，扣除非酶促反应作用，使反应体系中 GSH 浓度降低 1 μ mol/L 为一个酶活力单位 (U)。

计算公式：(液体类的样本均可按此公式计算)

$$\text{血清(浆) GSH - PX 活力 (U/mL)} = \frac{A_{\text{非酶管}} - A_{\text{酶管}}}{A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}} \times C_{\text{标准}} \times N \div V_{\text{样}} \div T \times N_{\text{样}}$$

C_{标准}：显色反应中的 GSH 标准液浓度，20 μ mol/L；

N：酶促反应体系稀释倍数，6 (2.4mL / 0.4mL，固定值)；

T: 反应时间, 5min;

V_#: 样本取样量, 0.1,mL;

N_#: 样本测试前稀释倍数。

三、血清（浆）的最佳取样浓度摸索举例：

1、**样本来源：**正常组大鼠眼眶取全血，肝素抗凝取血浆。

2、**样本前处理：**用生理盐水将血浆按 1：1、1：4、1：9、1：14、1：19 稀释成一系列不同浓度，分别取 0.1mL 按血清（浆）的测定操作表进行检测。

3、**测定结果：**

空白管吸光值		0.041	
标准管吸光值		0.163	
样本稀释比例	酶管吸光值	非酶管吸光值	抑制率
1：1	0.117	0.519	77.46%
1：4	0.283	0.520	45.58%
1：9	0.397	0.518	23.36%
1：14	0.421	0.516	18.41%
1：19	0.442	0.517	14.51%

4、**结论：**

从上面的数据统计可以看出，抑制率（ $\text{抑制率} = \frac{\text{非酶管OD值} - \text{酶管OD值}}{\text{非酶管OD值}} \times 100\%$ ）

在 45%~55%之间的最佳取样浓度为 1：4。即取 1：4 稀释正常组大鼠血浆 0.1mL 进行 GSH-PX 正式检测。

组织、细胞、线粒体中 GSH-PX 活力的测定

一、样本前处理：

- 1、组织样本前处理：**称取待测动物组织的重量，按重量 (g)：体积(mL)=1:9 的比例，加入 9 倍体积的生理盐水，低温 (0-4℃) 条件匀浆，3500 转/分，离心 10 分钟，取上清液待测 (制备好的匀浆上清液需要测定其蛋白浓度，蛋白测定试剂盒本公司有售)。
- 2、线粒体制备及前处理：**取 10% 的组织匀浆 5~10mL，以 1000~2000r/min 离心 10 分钟(用普通离心机或低温低速离心机)，取上清液以 8000~10000r/min (低温高速离心机) 离心 15 分钟，沉淀物为线粒体 (若不立即测定，可直接放 -20℃ 或 -80℃ 冰箱保存，3 个月内可用)。往线粒体中加入 0.2~0.3mL 的匀浆介质 (推荐生理盐水)，冰水浴条件下超声破碎(功率:300W,3~5 秒/次,间隔 30 秒，重复 3~5 次)，制备好的匀浆液若比较均匀可不离心直接测定。也可采用裂解液裂解(推荐 TritonX-100, 1~2% 浓度 0.1mL，冰上裂解 30~40 分钟)，裂解好的液体可不离心直接测定 (制备好的匀浆液需要测定其蛋白浓度，蛋白测定试剂盒本公司有售)。
- 3、细胞样本前处理：**(贴壁细胞) 用细胞刮配合等渗 PBS 刮下或用胰酶消化下来 (消化后加入 0.5-1mL 等渗 PBS 冲洗)，再将细胞悬液转移到另一离心管

中, 1000 转/分, 离心 10 分钟, 弃上清液, 留细胞沉淀; 用等渗 PBS 再清洗 1~2 次, 同样 1000 转/分, 离心 10 分钟, 弃上清液, 留细胞沉淀 (若不立即测定, 可直接放 -20℃ 或 -80℃ 冰箱保存, 3 个月内可用); 往细胞沉淀中加入 0.2~0.3mL 的匀浆介质 (推荐生理盐水) (加完匀浆介质后轻轻混匀细胞溶液, 使其均匀, 吸取少量进行细胞计数; 若是破碎后可以测蛋白, 则不用细胞计数), 冰水浴条件下超声破碎 (功率: 200~300W, 3~5 秒/次, 间隔 15 秒, 重复 3~5 次) 或手动匀浆, 制备好的匀浆液若比较均匀可不离心直接测定。也可采用裂解液裂解 (推荐 TritonX-100, 1~2% 浓度 0.1mL, 冰上裂解 30~40 分钟), 裂解好的液体可不离心直接测定。[注]: 建议细胞数在 100 万个以上 (越多测定效果越好)。破碎好的液体可显微镜观察细胞是否破碎完全。

二、GSH-PX 活力测定操作表: (分两步反应)

(1)、酶促反应: (试剂一应用液提前 5min 在 37℃ 预温)

	非酶管	酶管
1mmol/L GSH (mL)	0.2	0.2
待测匀浆 (mL)		0.2
37℃ 预温 5 分钟		
试剂一应用液 (mL)	0.1	0.1

37℃ 准确反应 5 分钟		
试剂二应用液 (mL)	2	2
待测匀浆 (mL)	0.2	
混匀, 3500~4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液 1mL 作显色反应		

(2)、显色反应:

	空白管	标准管	非酶管	酶 管
标准品稀释液 (mL)	1.0			
20 μ mol/L GSH 标准液 (mL)		1.0		
上清液 (mL)			1.0	1.0
试剂三应用液 (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0
试剂四应用液 (mL)	0.25	0.25	0.25	0.25
试剂五应用液 (mL)	0.05	0.05	0.05	0.05

混匀, 室温静置 15 分钟后, 412nm, 1cm 光径比色杯, 蒸馏水调零, 测各管吸光值 A (或是每管吸出 200 μ L 反应液, 加到 96 孔板中, 酶标仪 412nm 处读数)。

三、组织中 GSH-PX 活力的计算:

定义: 每毫克蛋白质 37℃ 每分钟扣除非酶反应的作用, 使反应体系中 GSH 浓度降低 1 μ mol/L 为一个酶活力单位 (U)。

【注意】组织蛋白的测定：参照实验方法学中的考马斯亮兰法、BCA 法、紫外法及磺基水杨酸法测出所取样本中的蛋白毫克数。

计算公式：

$$\text{组织GSH - PX活力 (U/mgprot)} = \frac{A_{\text{非酶管}} - A_{\text{酶管}}}{A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}} \times C_{\text{标准}} \times N \div T \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}})$$

C_{标准}：显色反应中的 GSH 标准液浓度，20 $\mu\text{mol/L}$ ；

N：酶促反应体系稀释倍数，5（2.5mL/0.5mL，固定值）；

T：酶促反应时间，5min；

V_样：酶促反应样本取样量，0.2mL；

C_{pr}：匀浆液蛋白浓度，mgprot/mL（prot 指蛋白）。

【注】：酶促反应体系如有改变，计算时实际的 V_样 需乘以体系改变的系数（如酶促反应体系缩小 2 倍后，取样 0.1mL，计算时 V_样 应为 0.1mL \times 2=0.2mL）。

四、组织匀浆的最佳取样浓度及最佳取样量的摸索举例：

- 1、样本来源：**正常小鼠肝组织，加生理盐水制备成 10% 的肝匀浆上清待测。
- 2、样本前处理：**用生理盐水将 10% 肝匀浆稀释成 0.5%、0.4%、0.3%、0.25%、0.2%、0.1%、0.05% 浓度，分别取 0.2mL 按组织的测定操作表进行检测。
- 3、测定结果：**

空白管吸光值		0.041	
标准管吸光值		0.163	
样本浓度	酶管吸光值	非酶管吸光值	绝对吸光值
0.05%	0.411	0.463	0.052
0.1%	0.356	0.464	0.108
0.2%	0.283	0.462	0.179
0.25%	0.244	0.461	0.217
0.3%	0.213	0.462	0.249
0.4%	0.175	0.461	0.286
0.5%	0.145	0.460	0.315
1.0%	0.085	0.460	0.375

4、结论：从上面的数据统计可以看出，0.25%的匀浆液非酶管吸光值-酶管吸光值为0.217。即取0.25%正常组小鼠肝组织匀浆0.2mL进行GSH—PX正式检测。

全血中 GSH-PX 活力的测定

一、样本的前处理：溶血液的配制

- ①、取人肝素抗凝全血 20 μ L，以蒸馏水稀释至 1mL，配成 1：49 的溶血液；鼠血 10 μ L 加蒸馏水至 1mL，配成 1：99 的溶血液。充分混匀，放置 5 分钟直至使玻璃管中的溶血液对光呈完全透明状，方可进行检测。
- ②、已配好的溶血液中 GSH-PX 活力只能保持 45~60 分钟，天冷时可延迟至 120 分钟。如果当天来不及测定则以抗凝全血冰箱（4 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C）保存，2~3 天内酶活力变化不大。

【注 1】请在正式实验前做预实验，详见溶血液最佳取样浓度及取样量的摸索举例；

【注 2】测溶血液中 GSH-PX 含量要注意样品测试前红细胞一定要充分溶血。（以对光观察透亮为标准，若不透亮可以冻溶一次，但有部分大鼠及猪的红细胞是不可放置 0 $^{\circ}$ C 以下，否则不易溶血，例如糖尿病大鼠和部分正常大鼠的红细胞冻后很难溶血。在做正式试验前最好先取 1~2 只样本做预试。）

二、全血中 GSH-PX 酶活力测定操作步骤：（分两步反应）

(1)、酶促反应：（试剂一应用液提前在 37 $^{\circ}$ C 预温）

	非酶管	酶管
1mmol/L GSH 标准液 (mL)	0.2	0.2

待测溶血液 (mL)		0.2
37℃ 预温 5 分钟		
试剂一应用液	0.1	0.1
37℃ 准确反应 5 分钟		
试剂二 (mL)	2	2
待测溶血液 (mL)	0.2	
混匀, 3500~4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清 1mL 作显色反应		

(2)、显色反应:

	空白管	标准管	非酶管	酶管
GSH 标准品稀释液 (mL)	1			
20 μ mol/L GSH 标准液 (mL)		1		
上清液 (mL)			1	1
试剂三 (mL)	1	1	1	1
试剂四 (mL)	0.25	0.25	0.25	0.25
试剂五应用液 (mL)	0.05	0.05	0.05	0.05

混匀, 室温静置 15 分钟后, 412nm, 1cm 光径比色杯, 蒸馏水调零, 测各管吸光值 A (或是每管吸出 200 μ L 反应液, 加到 96 孔板中, 酶标仪 412nm 处读数)。

三、全血中 GSH-PX 活力的计算:

定义: 每毫升全血在 37℃ 每分钟扣除非酶促反应的作用, 使反应体系中 GSH 浓度降低 1 μ mol/L 为一个酶活力单位 (U)。

$$\text{计算公式: 全血中 GSH - PX 活力 (U/mL)} = \frac{A_{\text{非酶管}} - A_{\text{酶管}}}{A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}} \times C_{\text{标准}} \times N \div V_{\text{样}} \div T \times N_{\text{样}}$$

C_{标准}: 显色反应中的 GSH 标准液浓度, 20 μ mol/L;

N: 酶促反应体系稀释倍数, 5 (2.5mL/0.5mL, 固定值);

V_样: 酶促反应样本加入量, 0.2mL;

T: 酶促反应时间, 5min;

N_样: 全血制备成溶血液过程中的稀释倍数。

四、溶血液的最佳取样浓度摸索举例:

1、**样本来源:** 正常组新鲜大鼠尾部肝素抗凝全血。

2、**样本前处理:** 分别用蒸馏水将大鼠全血按 1:49、1:59、1:69、1:79、1:89、1:99、1:149、1:199 的比例稀释成不同浓度的溶血液, 分别取 0.2mL 按全血的测定操作表进行检测。

3、**测定结果:**

空白管吸光值		0.041	
标准管吸光值		0.163	
样本浓度	酶管吸光值	非酶管吸光值	抑制率
1 : 49	0.096	0.452	78.76%
1 : 59	0.107	0.450	76.22%
1 : 69	0.118	0.452	73.89%
1 : 79	0.130	0.450	71.11%
1 : 89	0.144	0.450	68.00%
1 : 99	0.163	0.449	63.70%
1 : 149	0.231	0.450	48.67%
1 : 199	0.298	0.449	33.63%

4、结论：

从上面的数据统计可以看出，抑制率（抑制率 = $\frac{\text{非酶管OD值} - \text{酶管OD值}}{\text{非酶管OD值}} \times 100\%$ ）在 45%~55% 之间的最佳取样浓度为 1 : 149。即取 1 : 149 稀释的正常组小鼠尾全血 0.2mL 进行 GSH-PX 正式检测。

注 意 点

- 1、溶血液在室温下 1 小时内活力不变，建议样品稀释后不超过 1 小时测试为宜。
- 2、血样要新鲜，肝素抗凝后放冰箱 4~8℃ 存放不要超过 48 小时。
- 3、测溶血液中 **GPX** 活性要注意样品测试前红细胞一定要充分溶血。（以对光观察透亮为标准，若不透亮可以冻溶一次，但有部分大鼠及猪的红细胞是不可冻溶越冻越不破，最好先取 1~2 只样本做预试）。
- 4、酶促反应离心后有悬浮物无法分离时，可加入 0.1mL 氯仿涡旋震荡 30 秒再离心。
- 5、酶促反应的 37℃ 水浴反应时间 5 分钟，记录反应时间要准确。
- 6、有的样本酶管吸光值和非酶管吸光值接近，此为样本 **GPX** 活性较低的缘故（且计算结果误差会比较大），这种情况可考虑增加样本浓度或样本量以及延长反应时间来改善测试效果。
- 7、样本匀浆上清液当天提取，当天测试。组织蛋白质的测定法有多种，可购买本公司蛋白定量试剂盒。
- 8、试剂二甲粉溶解时不要用隔水加热的方式（因受热较慢导致溶解困难），而是需要直接加热才行（如电炉或酒精灯等），且加热时不断搅拌。

附录：GSH 标准曲线的制备(参考)

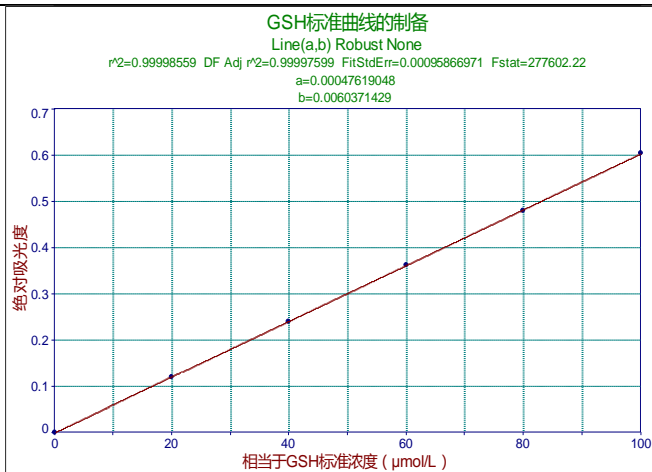
1、操作表：(只需要做显色反应)

管 号	1	2	3	4	5	6
100 μ mol/L GSH 标准液(mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
试剂二应用液 (mL)	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0
试剂三应用液 (mL)	1	1	1	1	1	1
试剂四应用液 (mL)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
试剂五应用液 (mL)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
混匀，室温静置 15 分钟，1cm 光径，412nm 处，蒸馏水调零，测各管吸光值						

2、测定结果：

管 号	1	2	3	4	5	6
相当于 GSH 浓度(μ mol/L)	0	20	40	60	80	100
本所参考吸光度	0.043	0.165	0.285	0.406	0.525	0.648
绝对吸光度	0	0.122	0.242	0.363	0.482	0.605

3、绘图：以 GSH 标准品浓度为横坐标，绝对吸光值为纵坐标，作标准曲线：



标准曲线用户可以不制作,若有需要可以按上述方法制作。

南京建成生物工程有限公司

地 址:	南京市中央路 258-27 号 新立基大厦 11 层 1106 室	销 售:	(025) 83360321/83360969
		财 务:	(025) 83112287
联系人:	季建平	建成主页:	www.njjcbio.com
技术支持:	(025) 83360272/83360217 19951670086(手机) 800033596(QQ)	E-mail:	njjcbio@vip.163.com