# 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒(微板法)

## 产品简介:

谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione Peroxidase，GSH-Px)是一种含硒的水溶性四聚体蛋白酶，几乎在所有组织中都有分布，在一些病理状况下谷胱甘肽过氧化物酶的活力会发生明显的变化，该酶可以清除活细胞内过氧化物，在保护细胞免受自由基损伤过程中起着关键作用，细胞内的脂类容易和自由基发生反应，产生脂类过氧化物；谷胱甘肽过氧化物酶不仅具有消除自由基和衍生物的作用，还与过氧化氢酶(CAT)、磷脂氢过氧化物谷胱甘肽过氧化物酶(PH-GSH-Px)、谷胱甘肽 S 转移酶(GST)构成不同基质特异性的多水平的还原有机氢过氧化物系统，减少脂质过氧化物的形成，增强机体抗氧化损伤能力。

谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒(Glutathione Peroxidase Assay Kit)是一种以过氧化氢为底物，通过比色法检测细胞、组织或其它样品中谷胱甘肽过氧化物酶活性的试剂盒。绝大部分细胞内的谷胱甘肽过氧化物酶都是含硒的，且硒为该酶的活性中性组成部分，细胞内也有很少量的不含硒的谷胱甘肽过氧化物酶存在，本试剂盒检测的是最常见的含硒的谷胱甘肽过氧化物酶，该检测法的缺点谷胱甘肽过氧化物酶可以利用还原型谷胱甘肽(GSH)催化过氧化氢以及许多有机过氧化物，产生水或有机醇，在特殊情况下会影响检测准确性，硒是 GSH-Px 的必须组成部分，每分子该酶含有含有四分子硒，该酶的活性中心是硒半胱氨酸，测定该酶的活力可以衡量有机体硒水平，其检测原理是：GSH-Px 可催化谷胱甘肽(GSH)与苯甲酸显色液发生氧化反应，使之生成黄色阴离子，通过酶标仪检测 422nm 处吸光度值测定该阴离子的浓度，间接推算 GSH 减少的量。该试剂盒仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

## 产品组成:

| 编号 / 名称 | GCTE0700 100T | Storage |
|---|---|---|
| 试剂(A): 样品匀浆液 | 50ml | RT |
| 试剂(B): GSH | 15.4mg | 4℃ |
| 试剂(C): GSH 配制液 | 10ml | RT |
| 试剂(D): 氧化剂 | 2×1ml | 4℃ 避光 |
| 试剂(E): 酸性沉淀剂 | 50ml | RT |
| 试剂(F): GSH-Px Assay Buffer | 15ml | RT |
| 试剂(G): 苯甲酸显色液 | 3ml | -20℃ 避光 |
| 试剂(H): $ddH_2O$ | 50ml | RT |
| 使用说明书 | 1 份 | |

**自备材料：**

1、生理盐水或 PBS

2、离心管、1.5ml EP 管

3、96 孔板、酶标仪

4、水浴锅或恒温箱、离心机

**操作步骤**(仅供参考)**：**

1、样本处理：

①血清、血浆样本：从待测样本中分离出的血清或血浆不应有溶血，如果含有，应去除红细胞后检测，如超过检测范围，用生理盐水稀释后检测。血清去除红细胞的简易方法如下：用抗凝管收集血液，颠倒混匀，取至少 500μl 全血，4℃ 3000r/min 离心 5min，弃上清，用预冷的的 10 倍体积的样品匀浆液重悬红细胞沉淀，再次 4℃ 3000r/min 离心 5min，弃上清，加入约 4 倍体积预冷的 $ddH_2O$ 裂解红细胞沉淀，12000 r/min 离心 5min，取上清；亦可采用 ACK 红细胞裂解液等去除红细胞，取上清。

②组织样本：动物用含有 20U/ml Heparin 的生理盐水(0.9% NaCl containing 20U/ml Heparin)灌流清除血液后获取组织样品，按照每 20mg 组织加入 200μl 样品匀浆液的比例，用玻璃匀浆器在 4℃或冰浴匀浆，4℃ 12000 r/min 离心 10min，取上清。

③细胞样本：对于贴壁细胞，由于后续用于酶活性的测定，避免使用胰酶消化细胞，可用细胞刮或 EDTA 处理细胞收集细胞，细胞用 PBS 或生理盐水洗涤 1 次，按照每 $10^6$ 细胞加入 300~500μl 匀浆液的比例用玻璃匀浆器在 4℃或冰浴匀浆，4℃ 12000 r/min 离心 10min，取上清，用于酶活性的测定；亦可采用 Leagene RAPI 裂解液，参考相应说明裂解细胞样品，按照每 $10^6$ 细胞加入 100~200μl 裂解液的比例进行裂解，取上清。

④植物样本：称取 0.2g 新鲜样品或-80℃冻存的样品，放入预冷的研钵中，加入 2ml 预冷的磷酸缓冲液(0.05M，pH7.0)，在冰浴上研磨或匀浆，转入离心管，4℃ 12000r/min 离心 10~15min，取上清，用于酶活性的测定。

2、GSH 工作液的配制：取 0.5ml $ddH_2O$ 加入 15.4mg GSH 中，充分溶解并混匀，即获得 GSH 储存液(100mmol/L)，立即分装后-20℃保存，取适量的 GSH 储存液(100mmol/L)，按 GSH 配制液：GSH 储存液(100mmol/L)=99：1 的比例混合，即为 GSH 工作液(1mmol/L)，该溶液配制好以后可 4℃保存 1 天。

3、氧化工作液的配制：准确取氧化剂 0.1ml 加入 6.5ml $ddH_2O$，即为氧化储存液(100×)，4℃保存，临用前准确取氧化储存液(100×)0.1ml 加入 9.9ml $ddH_2O$，即为氧化工作液；4℃保存，1 天有效。

4、GSH-Px 酶促反应：参考下表，用离心管设置空白对照管、光照对照管、测定管，并按下表设置检测反应体系，依次加入试剂：

| 加入物质(ml) | 空白对照管 | 光照对照管 | 测定管 |
|---|---|---|---|
| GSH 工作液(1mmol/L) | — | 0.02 | 0.02 |
| 待测样品 | — | — | 0.02 |
| $ddH_2O$ | 0.02 | 0.02 | — |
| 混匀，置于 37℃水浴 5min。 | | | |
| 氧化工作液(提前 37℃预温) | — | 0.01 | 0.01 |
| 混匀，置于 37℃水浴 5min。 | | | |
| 酸性沉淀剂 | 0.08 | 0.2 | 0.2 |
| 3500g 离心 10min。 | | | |
| 取上清液 | — | 0.1 | 0.1 |

5、 GSH-Px 显色反应：参考下表，用 96 孔板或离心管设置空白对照孔/管、光照对照孔/管、测定孔/管，并按下表设置检测反应体系，依次加入试剂：

| 加入物质(ml) | 空白对照孔/管 | 本底对照孔/管 | 测定孔/管 |
|---|---|---|---|
| 取上清液 | — | 0.1 | 0.1 |
| 空白对照 | 0.1 | — | — |
| GSH-Px Assay Buffer | 0.125 | 0.125 | 0.125 |
| 苯甲酸显色液 | 0.025 | 0.025 | 0.025 |

6、GSH-Px 测定：混匀，置于室温孵育 1min，以 $ddH_2O$ 调零，用酶标仪检测 422nm 处吸光度(即为 $A_{空白}$、$A_{本底}$、$A_{测定}$)；如果用酶标仪 96 孔板每孔应加 250μl；如果用分光光度计，比色杯光径应为 1cm，加入的量应根据比色杯的最小量程而定；经 Leagene 测定，一般情况下 $A_{空白}$在 0.003~0.05 之间，$A_{本底}$在 0.1~0.3 左右。

## 计算：

谷胱甘肽过氧化物酶活力单位的定义：排除非酶促反应，在 37℃，每 1L 血清， 1min 内可以催化 1μmol GSH 氧化所需(减少)的酶量为一个 GSH-Px 活性单位。

$$GSH\text{-}Px(U/L)= (A_{本底} - A_{测定})/(A_{本底} - A_{空白})\times 200$$

式中：$A_{空白}$=空白对照的吸光度

$A_{本底}$=本底对照的吸光度

$A_{测定}$=待测样品的吸光度

200=1000(ml)/5(min)

注：a.[检测体系中谷胱甘肽过氧化物酶活力]的单位为 U/L=mU/ml。

b.[样品(如组织样本)中谷胱甘肽过氧化物酶活力] = [检测体系中谷胱甘肽过氧化物酶活力]×[稀释倍数]/[样品中的蛋白浓度]

[样品中(如组织样本)谷胱甘肽过氧化物酶活力]的单位为：U/mg 或 mU/mg 蛋白

[样品中的蛋白浓度]的单位为：mg/ml。

c.计算示例：样品的蛋白浓度经测定为 0.5mg/ml，稀释 2 倍后进行测定。一般情况下，$A_{空白}$在 0.003~0.05 之间，$A_{本底}$在 0.10~0.3 左右。如果 $A_{本底}=0.30$，$A_{测定}=0.20$，$A_{空白}=0.003$ 那么:

液体样本 GSP-Px 活力=(0.30-0.2)/(0.30-0.003)×200×2=134.7U/L

组织样本 GSP-Px 活力=134.7U/L×2/(0.5mg/ml)=538.8mU/mg(蛋白)

**参考区间：**成年人血清 GSP-Px：115~140 U /L

**注意事项：**

1、 上述低温试剂避免反复冻融，以免失效或效率下降。
2、 本法中所有氧化剂或还原剂都会干扰本试剂盒的测定，如果在样品中的还原剂无法避免，例如 DTT、巯基乙醇等，则这些还原剂的总浓度至少低于 0.1mM；0.15mM 的 DTT 可以抑制 40%的酶活力。
3、 常用的 Triton X-100、Tween 20 等去垢剂都含有较高水平的过氧化物，会影响本试剂盒的测定，如果必须使用这些去垢剂，最好使用纯度较高并注明含较低浓度过氧化物的去垢剂。
4、 样品取出后最好立即测定，也可以-80℃冻存待以后测定。
5、 一定要严格控制反应时的温度，否则会引起较多误差。
6、 试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。
7、 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

**有效期：**12 个月有效。低温运输，按要求保存。

**相关产品：**

| 产品编号 | 产品名称 |
|---|---|
| GCDC0032 | Masson 三色染色液 |
| GCDM0007 | 瑞氏-姬姆萨复合染色液 |
| GCDP0013 | GUS 染色液(即用型) |
| GCPS0013 | RIPA 裂解液(强) |
| GCTC0699 | 植物总糖和还原糖检测试剂盒(DNS 比色法) |
| GCTC1167 | 尿素(Urea)检测试剂盒(脲酶波氏比色法) |