谷胱甘肽过氧化物酶（GPX/GSH-Px）活性检测试剂盒（微量法）
（本试剂盒仅供科研使用）

产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0250	谷胱甘肽过氧化物酶（GPX/GSH-Px）活性检测试剂盒	100 管/96 样

产品内容

名称	规格	储存条件
试剂一	液体×1 瓶	室温
试剂二	粉剂 ×1 瓶	4℃
试剂三	液体×1 支	-20℃
混合试剂配制：临用前，在试剂二中加入试剂一 20mL，充分震荡溶解后加入全部试剂三， 混匀。（当天用完）		
试剂四	液体×1 瓶	4℃

一、产品说明

GSH-Px 是谷胱甘肽氧化还原循环中催化还原型谷胱甘肽(GSH)氧化的主要酶之一。GSH-Px 不仅能够特异地催化还原型谷胱甘肽与 ROS 反应，生成氧化型谷胱甘肽 GSSG，从而保护生物膜免受 ROS 的损害，维持细胞的正常功能；而且具有保护肝脏、提高机体免疫力、拮抗有害金属离子对机体的伤害和增加机体抗辐射等能力。

GSH-Px 催化 H2O2 氧化 GSH, 产生 GSSG; 谷胱甘肽还原酶(GR)催化 NADPH 还原 GSSG, 再生 GSH， 同时 NADPH 氧化生成 NADP+；NADPH 在 340nm 有特征吸收峰，而 NADP+没有；通过测定 340nm 光吸收减少速率来计算 GSH-Px 活性。

二、自备材料

紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅、冷冻离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、蒸馏水。

三、样品准备

1、组织：按照组织质量（g）：试剂一体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）进行冰浴匀浆。8000g，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

2、细菌或培养细胞：按照细胞数量（104 个）：试剂一体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 8000g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。

3、血清或血浆：直接检测。

四、操作步骤

正式测定前，必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

2、混合试剂在 25℃或者 37℃（哺乳动物）水浴中预热 30min。

3、空白管：依次在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 20μL 蒸馏水、160μL 预热的混合试剂、

20μL 试剂四，迅速混匀后于 340nm 处测定第 10s 和第 190s 的吸光值，记为 A 空 1 和 A 空 2，ΔA=A 空 1-A 空 2。**空白管只继续测一次。**

4、测定管：依次在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 20μL 上清液、160μL 预热的混合试剂、20μL 试剂四，迅速混匀后于 340nm 处测定第 10s 和第 190s 的吸光值，记为 A 测 1 和 A 测 2，ΔA=A 测 1-A 测 2。

五、GSH-Px 活性的计算

A. 用 96 孔板测定的计算公式如下：

1、按照样本蛋白浓度计算：

单位定义：一定温度中，每 mg 蛋白每分钟催化 1nmoL NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

GSH-Px (nmoLmin/mg prot)=[(△A 测定管-△A 空白管)÷ε÷d×V 反总×10^9]÷ (Cpr×V 样) ÷T =1072×(△A 测定管-△A 空白管)÷Cpr。

2、按照样本鲜重计算：

单位定义：一定温度中，每 g 样本每分钟催化 1nmoL NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

GSH-Px (nmoL/min/g)=[(△A 测定管-△A 空白管)÷ε÷d×V 反总×10^9]÷(W×V 样÷V 样总)÷T = 1072 × (△A 测定管-△A 空白管)÷W。

3、按照细胞/细菌数量计算：

单位定义：一定温度中，每 10^4 个细胞每分钟催化 1nmoLNADPH 氧化为 1 个酶活单位。

GSH-Px (nmoL/min/10^4ceLL)= [(△A 测定管-△A 空白管)÷ε÷d×V 反总×10^9]÷(细胞数量×V 样÷V 样总) ÷T = 1072×(△A 测定管-△A 空白管)÷细胞数量。

4、按照血清/血浆体积计算：

单位定义：一定温度中，每毫升液体每分钟催化 1nmoL NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

GSH-Px (nmoL/min/mL)=[(△A 测定管-△A 空白管)÷ ε ÷d × V 反总 × 10^9]÷V 样÷T = 1072 × (△A 测定管-△A 空白管)。

ε：NADPH 摩尔消光系数 6.22 × 10^3 L/moL/cm；d：96 孔板光径，0.5 cm；V 反总：反应体系总体积，200μL=2 × 10^{-4} L；10^6：1moL=1 × 10^6 μ moL； Cpr：上清液蛋白浓度 (mg/mL)；W ：样品质量；V 样：加入反应体系中上清液体积，20μL =2 × 10^{-2} mL；V 样总：提取液体积，1mL；T： 反应时间，3min。

B. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下：

1、按照样本蛋白浓度计算：

单位定义：一定温度中，每 mg 蛋白每分钟催化 1nmoL NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

GSH-Px (nmol/min/mg prot)=[(△A 测定管-△A 空白管)÷ε÷d×V 反总×10^9]÷ (Cpr×V 样) ÷T =536×(△A 测定管-△A 空白管)÷Cpr。

2、按照样本鲜重计算：

单位定义：一定温度中，每 g 样本每分钟催化 1nmoL NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

GSH-Px (nmol/min/g)=[(△A 测定管-△A 空白管)÷ε÷d×V 反总×10^9]÷(W×V 样÷V 样总)÷T = 536×(△A 测定管-△A 空白管)÷W。

3、按照细胞/细菌数量计算：

单位定义：一定温度中，每 10^4 个细胞每分钟催化 1nmoLNADPH 氧化为 1 个酶活单位。

GSH-Px (nmol/min/10^4ceLL)= [(△A 测定管-△A 空白管)÷ε÷d×V 反总×10^9]÷(细胞数量×V 样÷V 样总)÷T = 536×(△A 测定管-△A 空白管)÷细胞数量。

4、按照血清/血浆体积计算：

单位定义：一定温度中，每毫升液体每分钟催化 1nmoL NADPH 氧化为 1 个酶活单位。

GSH-Px (nmol/min/mL)=[(△A 测定管-△A 空白管)÷ε÷d×V 反总×10^9]÷V 样÷T

=536×(△A 测定管-△A 空白管)。

ε：NADPH 摩尔消光系数 6.22×10^3 L/mol/cm；d：比色皿光径，1 cm；V 反总：反应体系总体积，200μL=2×10^{-4} L；10^6：1 mol=1×10^6μmol； Cpr：上清液蛋白浓度（mg/mL）；W ：样品质量；V 样：加入反应体系中上清液体积，20μL =2×10^{-2} mL；V 样总：提取液体积，1mL；T：反应时间，3 min。

六、注意事项

1、 样品处理等过程均需要在冰上进行，且须在当日测定酶活力。

2、 混合试剂和底物液须临用前配制，配完后置于冰上，当天使用完。

3、 测定过程操作须迅速。

4、 细胞中 GSH-Px 活性测定时，细胞数目须在 300 万-500 万之间，细胞中 GSH-Px 的提取时可加试剂一后研磨或超声波处理，不能用细胞裂解液处理细胞。