

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K809-M

产品规格: 48T(46 samples)/96T(94 samples)

检测仪器: 酶标仪(340 nm)

## Elabscience®细胞谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)

### 比色法测试盒

## Cell Glutathione Peroxidase (GPX) Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: [biochemical@elabscience.cn](mailto:biochemical@elabscience.cn)

网址: [www.elabscience.cn](http://www.elabscience.cn)

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

## 用途

本试剂盒适用于检测细胞样本中的谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)的活力。

## 检测原理

谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GPX)在保护细胞免受过氧化氢分解形成自由基的损害方面起着至关重要的作用。细胞的脂质成分易与自由基反应,导致脂质过氧化。GPX 利用谷胱甘肽将过氧化物还原为醇,从而防止细胞受到损害。

GPX 催化底物生成的产物消耗还原剂。还原剂在 340 nm 处有最大吸光度,通过计算反应消耗的还原剂的量来计算出 GPX 的酶活。

本试剂盒检测细胞样本时,需测定总蛋白浓度,推荐使用 BCA 法。(货号: E-BC-K318-M)。

## 提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	25 mL×1 瓶	50 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	0.25 mL×1 支	0.5 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	氧化剂 (Oxidant)	0.15 mL×1 支	0.3 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	还原剂 (Reductant)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	促进剂 (Accelerant)	4 mL×1 瓶	8 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	稳定剂 (Stabilizer)	0.5 mL×1 支	1 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂八 (Reagent 8)	细胞裂解液 (Cell Lysis Buffer)	7 mL×1 瓶	14 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
	96 孔紫外酶标板	1 板		
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

## 所需自备物品

仪器：酶标仪(最佳检测波长 340 nm)、37 °C 恒温箱

## 试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 试剂二工作液配制：

取一支试剂二加入250  $\mu\text{L}$ 双蒸水，溶解混匀，未使用完的试剂可在-20  $^{\circ}\text{C}$ 避光保存2天。

③ 试剂四工作液的配制：

将试剂一:试剂四按体积比=19:1配制，置于冰上避光待用，现配现用，按需配制，2 h内使用有效。

④ 试剂五工作液配制：

取一支试剂五加入500  $\mu\text{L}$ 双蒸水，溶解混匀，未使用完的试剂可在-20  $^{\circ}\text{C}$ 避光保存2天。

⑤ 测定工作液的配制：

将试剂一:试剂二工作液:试剂三:试剂五工作液:试剂六按体积比=165: 2: 5: 5: 80配制，置于冰上避光待用，现配现用，按需配制，2 h内使用有效。

## 样本准备

### ① 样本处理

细胞样本：按照约 $1 \times 10^6$ 个细胞：试剂八体积( $\mu\text{L}$ ): 试剂七体积( $\mu\text{L}$ )= 1: 99: 1比例匀浆(如 $1 \times 10^6$ 个细胞，加入99  $\mu\text{L}$ 试剂八和1  $\mu\text{L}$ 试剂七)。置于冰上裂解10 min，每5 min混匀一次。4  $^{\circ}\text{C}$ ，10000  $\times\text{g}$ 离心10 min，取上清置于冰上待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

### ② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：3.22-446.95 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
$1.9 \times 10^6$ 个 HL-60 细胞	不稀释	$1.4 \times 10^6$ 个 293T 细胞	不稀释
$2 \times 10^6$ 个 CHO 细胞	不稀释	$1.9 \times 10^6$ 个 4T1 细胞	不稀释
$2.03 \times 10^6$ 个 Jurkat 细胞	不稀释		

注：稀释液为试剂八。

## 实验关键点

在样本测定时，测定孔  $A_2$  值应大于 0.2，若测定孔  $A_2$  小于 0.2 需要将样本稀释后再测定。

## 操作步骤

- ① 测定孔：取 20  $\mu\text{L}$  待测样本加入相应的酶标板孔中。  
空白孔：取 20  $\mu\text{L}$  试剂八加入相应的酶标板孔中。
- ② 向步骤①中各孔加入 180  $\mu\text{L}$  测定工作液。
- ③ 向步骤②中各孔加入 40  $\mu\text{L}$  试剂四工作液。
- ④ 振板 5 s，加入试剂四工作液后立即在酶标仪 340 nm 波长下检测各孔 OD 值  $A_1$ ，室温孵育 10 min 后测定各孔 OD 值  $A_2$ 。样本反应速率较快，如果没有及时测定  $A_1$ ，可能会导致样本测定值低或测不出值。

## 操作表

	测定孔	空白孔
待测样本( $\mu\text{L}$ )	20	--
试剂八( $\mu\text{L}$ )	--	20
测定工作液( $\mu\text{L}$ )	180	180
试剂四工作液( $\mu\text{L}$ )	40	40
振板 5 s，加入试剂四工作液后立即在酶标仪 340 nm 波长下检测各孔 OD 值 $A_1$ ，室温孵育 10 min 后测定各孔 OD 值 $A_2$ 。样本反应速率较快，如果没有及时测定 $A_1$ ，可能会导致样本测定值低或测不出值。		

本试剂盒检测胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法。(货号：**E-BC-K318-M**)。

## 结果计算

细胞样本中谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)活力计算公式:

定义: 25 ℃ 条件下, 每克细胞蛋白每分钟催化底物产生 1 μmol 的产物所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{GPX 活力 (U/gprot)} = (\Delta A_{340}) \div (\epsilon \times d) \times (V_{\text{反应}} \div V_{\text{样}}) \div T \times f \div C_{\text{pr}}$$

注解:

$\Delta A_{\text{测定}}$ : 测定孔的变化 OD 值( $\Delta A_{\text{测定}} = A_{1\text{测定}} - A_{2\text{测定}}$ )

$\Delta A_{\text{空白}}$ : 空白孔的变化 OD 值( $\Delta A_{\text{空白}} = A_{1\text{空白}} - A_{2\text{空白}}$ )

$\Delta A_{340}$ : 测定孔变化 OD 值-空白孔变化 OD 值( $\Delta A_{340} = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}$ )

$\epsilon$ : 显色产物在 340 nm 处的摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{ L}/\mu\text{mol}/\text{cm}$

$d$ : 96 孔紫外酶标板内 240 μL 反应体系光径, 0.60 cm

$V_{\text{反应}}$ : 反应的总体积, 0.24 mL

$V_{\text{样}}$ : 加入反应体系中样本上清液的体积, 20 μL=0.02 mL

$C_{\text{pr}}$ : 加入检测体系前样本的蛋白浓度, gprot/L

$f$ : 样本加入检测体系前的稀释倍数

$T$ : 反应时间, 10 min

## 附录 1 关键数据

### 1. 技术参数

检测范围	3.22-446.95 U/L	批间差	0.4-3.4 %
灵敏度	3.22 U/L	批内差	1.2-3.1 %
稀释回收率	96-100 %		

## 附录2 实例分析

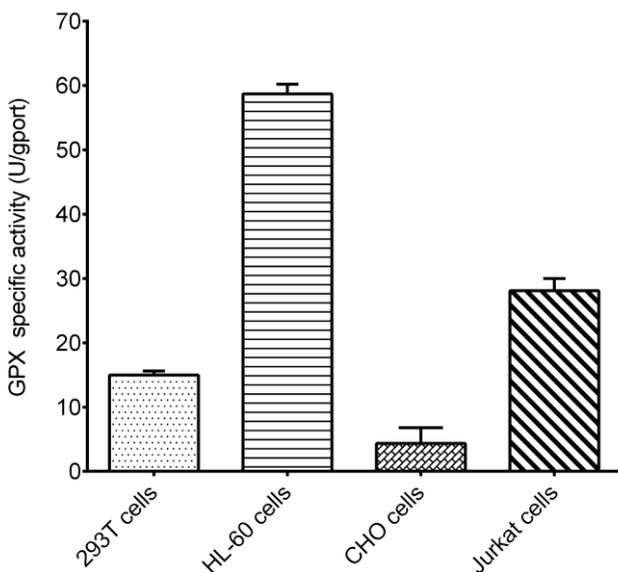
例如HL-60细胞(数据仅供参考):

取裂解好的HL-60细胞上清20  $\mu\text{L}$ , 加入到酶标板孔中, 按操作表操作, 结果如下:  $A_{1\text{测定}}$  为1.153,  $A_{2\text{测定}}$  为0.851,  $\Delta A_{\text{测定}} = A_{1\text{测定}} - A_{2\text{测定}} = 1.153 - 0.851 = 0.302$ ;  $A_{1\text{空白}}$  为1.163,  $A_{2\text{空白}}$  为1.157,  $\Delta A_{\text{空白}} = A_{1\text{空白}} - A_{2\text{空白}} = 1.163 - 1.157 = 0.006$ ;  $\Delta A_{340} = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}} = 0.302 - 0.006 = 0.296$ , 测定出HL-60细胞的蛋白含量为1.698 gprot/L, 计算结果为:

GPX 活力(U/gprot)=

$$0.296 \div (6.22 \times 10^{-3} \times 0.6) \times (0.24 \div 0.02) \div 10 \div 1.698 = 56.05 \text{ U/gprot}$$

按说明书操作, 测定293T细胞( $1.44 \times 10^6$ 个, 蛋白含量为1.235 gprot/L, 加样量20  $\mu\text{L}$ )、HL-60细胞( $1.88 \times 10^6$ 个, 蛋白含量为1.698 gprot/L, 加样量20  $\mu\text{L}$ )、CHO细胞( $2 \times 10^6$ 个, 蛋白含量为1.850 gprot/L, 加样量20  $\mu\text{L}$ )、Jurkat细胞( $2.03 \times 10^6$ 个, 蛋白含量为0.68 gprot/L, 加样量20  $\mu\text{L}$ )中的GPX活力(如下图):



### 附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本测不出值	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本，重新检测

#### 声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。





