（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-K096-M

产品规格：48T(16 samples)/96T(40 samples)

检测仪器：酶标仪（400-420 nm）

Elabscience®谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）比色法测试盒

Glutathione Peroxidase (GSH-Px) 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

网址：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血清、血浆、培养细胞、培养液及动植物组织样本中的 GSH-Px 活力。

检测原理

GSH-Px 可以促进过氧化氢（H_2O_2）与还原型谷胱甘肽（GSH）反应生成 H_2O 及氧化型谷胱甘肽（GSSG），反应式见下图。通过测定底物 GSH 在单位时间内被氧化的速度来表示酶的活力，反应剩余的 GSH 与二硫代双二硝基苯甲酸（DTNB）作用生成的黄色硫代硝基苯甲酸阴离子（TNB），测定该阴离子的浓度来计算出 GSH 的减少量。由于 GSH 在没有酶的条件下也能进行氧化（非酶反应），所以最后计算此酶活力时，必须扣除非酶反应引起的 GSH 减少的那部分。

$$H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{GSH\text{-}Px} 2H_2O + GSSG$$

$$GSH + DTNB \longrightarrow GSSG + TNB$$

本试剂盒在检测组织和细胞样本时，需要测定总蛋白浓度，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)(48T)	规格 2 (Size 2)(96T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	储备液 (Stock Solution)	0.5 mL×1 支	0.5 mL×1 支	2-8℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	酸试剂 (Acid Reagent)	25 mL×1 瓶	50 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	磷酸盐 (Phosphate)	12 mL×1 瓶	12 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	DTNB 溶液 (DTNB Solution)	3.5 mL×1 瓶	7 mL×1 瓶	2-8℃避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	GSH 标准品 (GSH Standard)	3.07 mg×1 支	3.07 mg×1 支	2-8℃ 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	GSH 标准品溶剂贮备液 (GSH Standard Stock Diluent)	1.5 mL×1 支	1.5 mL×2 支	2-8℃ 保存 6 个月
	96 孔酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求
	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（400-420 nm，最适检测波长 412 nm）、涡旋混匀仪、离心机、37℃恒温箱。

耗材：枪头（1000 μL，200 μL，10 μL ）、EP 管（10 mL、1.5 mL）。

试剂：双蒸水、生理盐水（0.9% NaCl）或 PBS（0.01 M，pH 7.4）。

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 试剂一应用液的配制：

按试剂一：双蒸水为1: 99体积比混匀，配成应用液，现用现配，2-8℃保存3天。

③ 试剂六应用液的配制：

按试剂六：双蒸水为1: 9体积比混匀，现用现配，若试剂六结成冰块，于65℃放置使其溶解即可。2-8℃保存7天。

④ 1 mmol/L GSH标准品的配制：

取一支试剂五加入10 mL试剂六应用液中，混匀，现用现配，未用完的部分，分装后-20℃可保存一个月。

⑤ 100 μmol/L GSH标准品的配制：

按1 mmol/L GSH溶液：试剂六应用液为1: 9体积比混匀，现用现配，2-8℃保存7天。

⑥ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(μmol/L)	**0**	**10**	**20**	**40**	**50**	**60**	**80**	**100**
100 μmol/LGSH 标准品（μL）	0	30	60	120	150	180	240	300
试剂六应用液(μL)	300	270	240	180	150	120	60	0

样本准备

① 样本处理

样本要求：样本中不能添加 DTT、2-巯基乙醇等还原性物质，不能添加 Triton X-100、Tween 等去污剂。

血清血浆等液体样本：直接测定。

组织样本：组织处理的匀浆介质为生理盐水（0.9% NaCl）或 PBS（0.01 M，pH 7.4）。匀浆后，4℃，10000 × g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。留取部分上清用于蛋白浓度测定。

细胞样本：取约 10^6 个细胞加入 300-500 μL 生理盐水（0.9% NaCl）或 PBS（0.01 M，pH 7.4）匀浆。匀浆后，4℃，10000 × g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。留取部分上清用于蛋白浓度测定。

② 样本抑制率的计算

本试剂盒可检测GSH-Px抑制率范围在10%-50%之间，最佳抑制率范围25%-45%，其对应的浓度为最佳取样浓度。

抑制率计算公式：

$$\text{抑制率\%}=\frac{\text{非酶管OD值-酶管OD值}}{\text{非酶管OD值}}\times 100\%$$

若抑制率大于50%时，则需将样品浓度稀释后再测试。若抑制率小于10%时，则需将样品浓度加大，或增加样本量。

③ 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异较大的样本稀释成不同浓度，选取抑制率在25%-45%的，样本的稀释倍数，进行正式批量实验，不同样本稀释比例范围如下表（仅供参考）：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
人血清	不稀释	10%大鼠肝脏匀浆	30-60
小鼠血清	3-5	HepG2 细胞匀浆（5 mgprot/mL）	不稀释

10%小鼠脑匀浆	不稀释	10%绿萝叶组织匀浆	不稀释
大鼠血清	5-8	10%小白菜叶组织匀浆	3-5

注：稀释液为生理盐水（0.9% NaCl）或 PBS（0.01 M，pH 7.4）。

实验关键点

① 非酶管及酶管加入试剂二离心后的上清液必须澄清。

② 样本处理后必须做预实验。

③ 试剂一应用液必须在 37℃预温 5 min。

④ 当抑制率小于 10%时，可增加样本量。

操作步骤

酶促反应：

① 非酶管：取 20 μL 1 mmol/L GSH 标准品，加入 1.5 mL EP 管中；

酶管：取 20 μL 1 mmol/L GSH 标准品，20 μL 待测样本，加入 1.5 mL EP 管中混匀。

② 将酶管、非酶管及试剂一应用液 37℃预温 5 min。

③ 向酶管和非酶管加入 10 μL 试剂一应用液，混匀，37℃准确反应 5 min。

④ 向非酶管加入 200 μL 试剂二和 20 μL 待测样本，混匀；向酶管加入 200 μL 试剂二，混匀。

⑤ 3100 × g 离心 10 min，取 100 μL 上清液作显色反应。（若上清液中含有部分沉淀物，将上清液转入新的 EP 管中，再次离心）

显色反应：

① 标准孔：取100 μL不同浓度标准品，加入到对应的标准孔中：

非酶孔：取100 μL非酶管中的上清，加入到非酶孔中；

酶孔：取100 μL酶管中的上清，加入到酶孔中。

② 向步骤①中各孔分别加入100 μL试剂三。

③ 向步骤②中各管分别加入50 μL试剂四。

④ 酶标仪上震板10 s，静置5 min，酶标仪412 nm，测其吸光度值。

注：当样本抑制率小于10%时，可增加样本量进行检测。

操作表

酶促反应：

	非酶管	酶管
1mmol/L GSH（μL）	20	20
待测样本（μL）	--	20
37℃预温 5 min（同时试剂一应用液 37℃预温 5 min）		
试剂一应用液（μL）	10	10
37℃准确反应 5 min		
试剂二（μL）	200	200
待测样本（μL）	20	--
涡旋混匀，3100 × g 离心 10 min，取上清 100 μL 作显色反应。		

显色反应：

	标准孔	非酶孔	酶孔
不同浓度标准品（μL）	100	--	--
上清液（μL）	--	100	100
试剂三（μL）	100	100	100
试剂四（μL）	50	50	50
酶标仪震板 10 s，室温静置 5 min，412 nm，酶标仪，测其吸光度值。			

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

结果计算

标准品拟合曲线：y = ax + b

血清（浆）及培养液的结果计算：

定义：规定每 0.1 mL 血清（浆）在 37℃反应 5 min，扣除非酶促反应作用，使反应体系中 GSH 浓度降低 1 μmol/L 为一个酶活力单位。

$$\text{GSH-Px 活力（U）} = (\Delta A_{412} - b) \div a \times \frac{0.23+V}{0.03+V} \times \frac{0.1}{V} \times f$$

组织及细胞的结果计算：

定义：规定在 37℃反应 5 min，扣除非酶反应的作用，每毫克蛋白质，使反应体系中 GSH 浓度降低 1 μmol/L 为一个酶活单位。

$$\text{GSH-Px 活力（U/mgprot）} = (\Delta A_{412} - b) \div a \times \frac{0.23+V}{0.03+V} \div (V \times C_{pr}) \times f$$

注解:

ΔA_{412}：非酶孔 OD 值-酶孔 OD 值

（0.23+V）/（0.03+V）：酶促反应体系被稀释的倍数

0.1/V：酶活定义中为 0.1 mL 血清（浆）的酶活，样本用量为 V mL

f：样本加入检测体系之前的稀释倍数

V：样本加样量（mL）

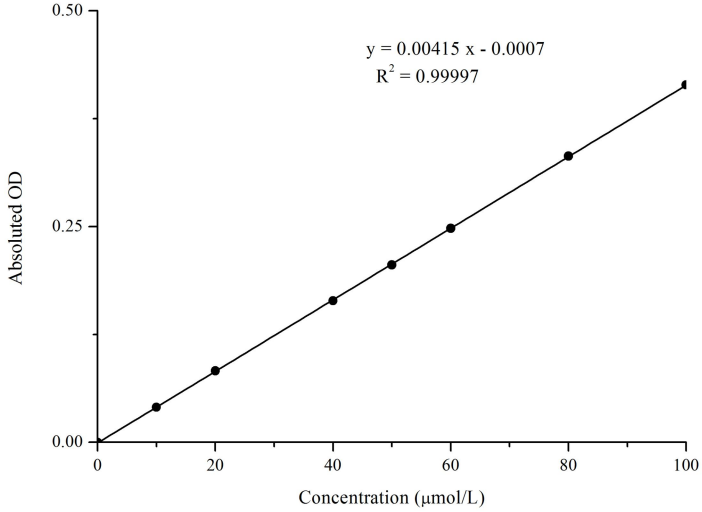
C_{pr}：待测样本的蛋白浓度（mgprot/mL）

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	34.34-1036.64 U	平均批间差	8.7%
灵敏度	34.34 U	平均批内差	2.4%
平均回收率	104 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)



附录2 实例分析

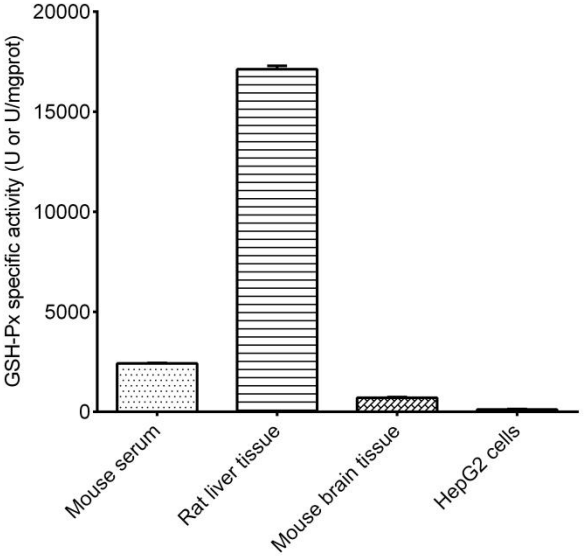
例如检测小鼠血清(数据仅供参考)：

取小鼠血清，用生理盐水（0.9% NaCl）稀释4倍，取20 μL稀释后的样本按操作表操作，结果如下：：

标准曲线：y=0.00415x-0.0007，非酶孔平均OD值：0.381，酶孔平均OD值0.263，计算结果为：

$$\text{GSH-Px 活力 (U)} = (0.381 - 0.263 + 0.0007) \div 0.00415 \times 5 \times 5 \times 4 = 2860.24\ \text{U}$$

按说明书操作，测定小鼠血清（稀释4倍，加样量20 μL）、大鼠肝脏组织（10%组织匀浆的蛋白含量14.05 mgprot/mL，稀释30倍，加样量20 μL）、小鼠脑组织（10%组织匀浆的蛋白含量4.20 mgprot/mL，加样量20 μL）、HepG2细胞（蛋白含量5.02 mgprot/mL，加样量20 μL）的GSH-Px活力（如下图）：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
复孔差大	加入试剂二离心后的上清液仍浑浊	可离心多次，确保上清液无浑浊
样本测不出酶活	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数，重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本，重新检测
	样本中 GSH-Px 活力低	增加上样量，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。

附录4 客户发表文献

1. Liu Y, Wang L, Liu Z, et al. Durable immunomodulatory nanofiber niche for the functional remodeling of cardiovascular tissue[J]. ACS nano, 2023, 18(1): 951-971. DOI: 10.1021/acsnano.3c09692.

2. Zhang H, Feng Y, Si Y, et al. Shank3 ameliorates neuronal injury after cerebral ischemia/reperfusion via inhibiting oxidative stress and inflammation[J]. Redox Biology, 2024, 69: 102983. DOI: 10.1016/j.redox.2023.102983.

3. Zhao Y, Yin W, Yang Z, et al. Nanotechnology-enabled M2 macrophage polarization and ferroptosis inhibition for targeted inflammatory bowel disease treatment[J]. Journal of Controlled Release, 2024, 367: 339-353. DOI: 10.1016/j.jconrel.2024.01.051.

4. Xu F, He Y, Xu A, et al. Triphenyl phosphate induces cardiotoxicity through myocardial fibrosis mediated by apoptosis and mitophagy of cardiomyocyte in mice[J]. Environmental Pollution, 2024, 346: 123651. DOI: 10.1016/j.envpol.2024.123651.

5. Leng B, Deng L, Tan J, et al. Targeting the Na+/K+ ATPase DR-region with DR-Ab improves doxorubicin-induced cardiotoxicity[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2023, 204: 38-53. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2023.04.008.