

(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。

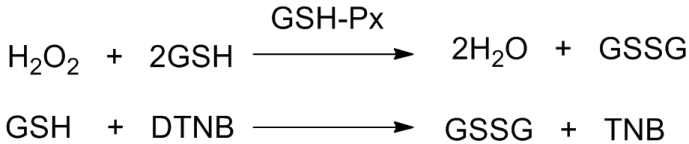
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

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。



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°C 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°C 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	磷酸盐 (Phosphate)	12 mL×1 瓶	12 mL×1 瓶	2-8°C 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°C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°C 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°C 保存 6 个月
	96 孔酶标板	48T	96T	
	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°C 恒温箱。

耗材：枪头（1000 μ L，200 μ L，10 μ L）、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/L GSH 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 10⁶ 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：

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

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°C 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 μ L 1 mmol/L GSH 标准品，加入 1.5 mL EP 管中；
酶管：取 20 μ L 1 mmol/L GSH 标准品，20 μ L 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°C 预温 5 min。
- ③ 向酶管和非酶管加入 10 μ L 试剂一应用液，混匀，37°C 准确反应 5 min。
- ④ 向非酶管加入 200 μ L 试剂二和 20 μ L 待测样本，混匀；向酶管加入 200 μ L 试剂二，混匀。
- ⑤ 3100 \times g 离心 10 min，取 100 μ L 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 μ L 不同浓度标准品，加入到对应的标准孔中；
非酶孔：取 100 μ L 非酶管中的上清，加入到非酶孔中；
酶孔：取 100 μ L 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 μ L 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°C预温 5 min (同时试剂一应用液 37°C预温 5 min)		
试剂一应用液 (μL)	10	10
37°C准确反应 5 min		
试剂二 (μL)	200	200
待测样本 (μL)	20	--
涡旋混匀，3100 \times 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°C 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 $\mu\text{mol/L}$ 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°C 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 $\mu\text{mol/L}$ 为一个酶活单位。

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

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）

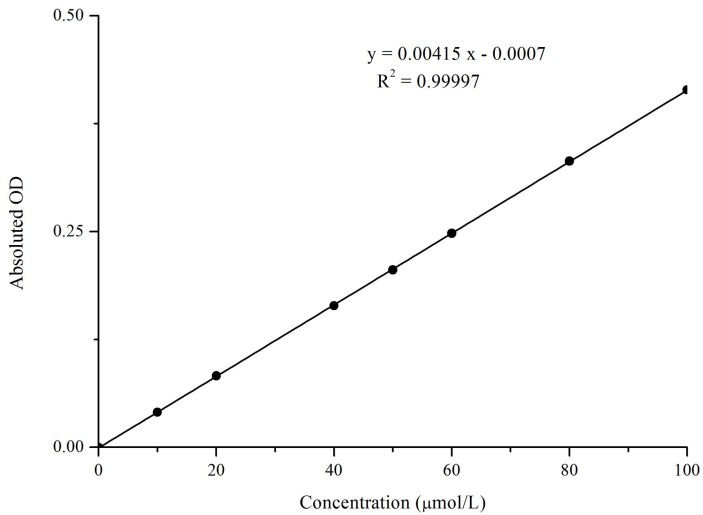
C_{pr} ：待测样本的蛋白浓度（mgprot/mL）

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

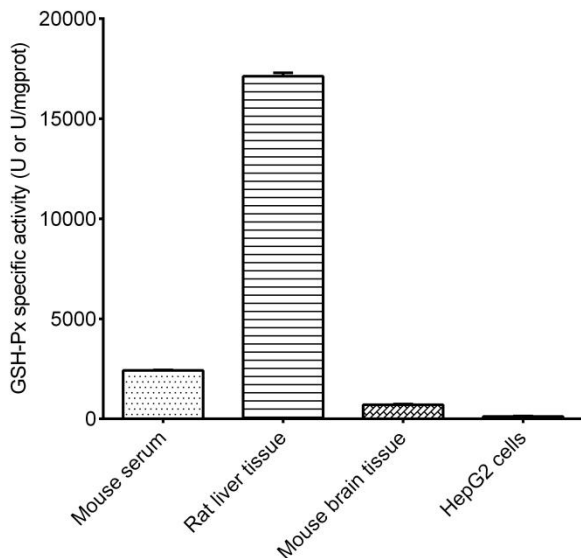
例如检测小鼠血清(数据仅供参考):

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. Du S, Zhou N, Xie G, et al. Surface-engineered triboelectric nanogenerator patches with drug loading and electrical stimulation capabilities: Toward promoting infected wounds healing[J]. *Nano Energy*, 2021, 85:106004. IF:17.087
2. Bartolini D, Arato I, Mancuso F, et al. Melatonin modulates Nrf2 activity to protect porcine pre-pubertal Sertoli cells from the abnormal H₂O₂ generation and reductive stress effects of cadmium. *J Pineal Res.* 2022;73 (1):e12806. IF:13.007
3. Yang Z, Wang J, Ai S, et al. Self-generating oxygen enhanced mitochondrion-targeted photodynamic therapy for tumor treatment with hypoxia scavenging[J]. *Theranostics*, 2019, 9(23): 6809. IF:11.556
4. Wan Q, Cao R, Wen G, et al. Sequential use of UV-LEDs irradiation and chlorine to disinfect waterborne fungal spores: Efficiency, mechanism and photoreactivation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 423:127102-. IF:10.588
5. Tian J, Wang L, Hui S, et al. Cadmium accumulation regulated by a rice heavy-metal importer is harmful for host plant and leaf bacteria. *J Adv Res.* 2022. IF:10.479
6. Jg A, Jie S B, Jy B, et al. Comparative toxicity reduction potential of UV/sodium percarbonate and UV/hydrogen peroxide treatments for bisphenol A in water: An integrated analysis using chemical, computational, biological, and metabolomic approaches[J]. *Water Research*, 2020, 190. IF:9.702
7. Yang X X, Xu X, Wang M F, et al. A nanoreactor boosts chemodynamic therapy and ferroptosis for synergistic cancer therapy using molecular amplifier dihydroartemisinin[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20(1):1-19. IF:9.464
8. Liu Z, Liu X, Yang Q, et al. Neutrophil membrane-enveloped nanoparticles for the amelioration of renal ischemia-reperfusion injury in mice[J]. *Acta Biomaterialia*, 2020, 104: 158-166. IF:8.947
9. Huang S, Le H, Hong G, et al. An all-in-one biomimetic iron-small interfering RNA nanoplatfrom induces ferroptosis for cancer therapy. *Acta Biomater.* 2022;148:244-257. IF:8.291
10. Alharbi YM, Sakr SS, Albarrak SM, et al. Antioxidative, Antidiabetic, and Hypolipidemic Properties of Probiotic-Enriched Fermented Camel Milk Combined with *Salvia officinalis* Leaves Hydroalcoholic Extract in Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11 (4):. IF:7.675