

(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-S

产品规格: 50 assays(24 samples)/100 assays(48 samples)

检测仪器: 紫外-可见光分光光度计 (412 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。

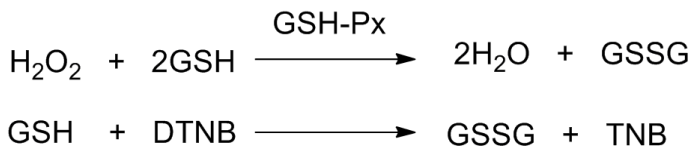
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

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), 反应式如下图。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)。

提供试剂和物品

| 编号 | 名称 | 规格 1(Size 1) (50 assays) | 规格 2(Size 2) (100 assays) | 保存方式 (Storage) |
|--------------------|---|-----------------------------|------------------------------|--------------------|
| 试剂一 (Reagent 1) | 储备液 (Stock Solution) | 1 mL×1 支 | 2 mL×1 支 | 2-8°C 保存 6 个月 |
| 试剂二 (Reagent 2) | 酸试剂 (Acid Reagent) | 60 mL×2 瓶 | 60 mL×4 瓶 | 2-8°C 保存 6 个月 |
| 试剂三 (Reagent 3) | 磷酸盐 (Phosphate) | 粉剂×1 瓶 | 粉剂×2 瓶 | 2-8°C 保存 6 个月 |
| 试剂四 (Reagent 4) | DTNB 溶液 (DTNB Solution) | 15 mL×1 瓶 | 30 mL×1 瓶 | 2-8°C避光 保存 6 个月 |
| 试剂五 (Reagent 5) | 盐试剂 (Salt Reagent) | 粉剂×2 支 | 粉剂×4 支 | 2-8°C避光 保存 6 个月 |
| 试剂六 (Reagent 6) | GSH 标准品 (GSH Standard) | 3.07 mg×1 支 | 3.07 mg×2 支 | 2-8°C 保存 6 个月 |
| 试剂七 (Reagent 7) | GSH 标准品溶剂储备液 (GSH Standard Stock Diluent) | 3 mL×1 瓶 | 6 mL×1 瓶 | 2-8°C 保存 6 个月 |

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：紫外-可见分光光度计（412 nm）、37°C恒温箱、涡旋混匀仪、磁力搅拌器、烧杯（250 mL）、离心机。

耗材：枪头（1000 μ L，200 μ L，10 μ L）、EP管（10 mL，5 mL，2 mL）、吸水纸、擦镜纸、磁力搅拌子。

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12 h。

③ 试剂三应用液的配制：

取1瓶试剂三用60 mL双蒸水搅拌溶解，2-8℃保存6个月，该试剂为饱和溶液，如有结晶，取上清进行实验。

④ 试剂五应用液的配制：

每1支试剂五加双蒸水10 mL溶解，2-8℃避光保存1个月。

⑤ GSH标准品溶剂应用液的配制：

按试剂七：双蒸水为1:9体积比混匀，现用现配，若试剂七结成冰块，于65℃放置使其溶解即可。

⑥ 1 mmol/L GSH溶液的配制：

取一支试剂六加10 mL GSH标准品溶剂应用液中，混匀，现用现配，未用完的部分，分装后-20℃可保存一个月。

⑦ 20 μmol/L GSH标准溶液：

按1 mmol/L GSH溶液：GSH标准品溶剂应用液为1: 49体积比混匀，现用现配。

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 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 最佳取样浓度的确定

本试剂盒可检测抑制率范围在20%-60 %之间，最佳抑制率范围45%-55%，其对应的取样浓度为最佳取样浓度。

抑制率计算公式：

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

注：因为酶的抑制率与活力呈抛物线关系，若抑制率大于60%时，则需将样品浓度稀释后再测试。若百分抑制率小于20%时，则需将样品浓度加大或者增加取样量。

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20%-60%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 | 1-3 | 小鼠血浆 | 4-8 |
| 大鼠血清 | 5-8 | 10%小鼠肝匀浆 | 20-40 |

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 试剂一应用液必须在 37°C 预温 5 min。

操作步骤

酶促反应：

- ① 非酶管：取 0.2 mL 1 mmol/L GSH，加入 5 mL EP 管中；
酶管：取 0.2 mL 1 mmol/L GSH，A mL 待测样本，加入 5 mL EP 管中，混匀；
(A 为加样量，参考加样量：血清（浆）为 0.1 mL；组织样本、培养细胞、培养液为 0.2 mL。)
- ② 将酶管、非酶管及试剂一应用液 37°C 预温 5 min。
- ③ 取出，向酶管和非酶管加入 0.1 mL 试剂一应用液，混匀，37°C 准确反应 5 min。
- ④ 向非酶管加入 2 mL 试剂二和 A mL 待测样本，混匀；向酶管加入 2 mL 试剂二，混匀。
- ⑤ 3100 × g 离心 10 min，取 1 mL 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 非酶管：取 1 mL 非酶管上清液，加入 5 mL 的 EP 管；
酶管：取 1 mL 酶管上清液，加入 5 mL 的 EP 管；
空白管：取 1 mL GSH 标准品溶剂应用液，加入 5 mL 的 EP 管；
标准管：取 1 mL 20 μmol/L GSH 标准液，加入 5 mL 的 EP 管；
- ② 向步骤①中各管分别加入 1 mL 试剂三应用液、0.25 mL 试剂四应用液、0.05 mL 试剂五应用液，混匀，室温静置 15 min。
- ③ 412 nm，1 cm 光径石英比色皿，双蒸水调零，测其吸光度。

操作表

酶促反应:

参考加样量: 血清(浆)为 0.1 mL; 组织样本、培养细胞、培养液为 0.2 mL。

| | 非酶管 | 酶管 |
|--|-----|-----|
| 1 mmol/L GSH (mL) | 0.2 | 0.2 |
| 待测样本 (mL) | -- | A |
| 37°C预温 5 min (试剂一应用液 37°C预温 5 min) | | |
| 试剂一应用液 (mL) | 0.1 | 0.1 |
| 37°C准确反应 5 min | | |
| 试剂二 (mL) | 2 | 2 |
| 待测样本 (mL) | A | -- |
| 涡旋混匀, 3100 ×g 离心 10 min, 取上清 1 mL 作显色反应。 | | |

显色反应:

| | 空白管 | 标准管 | 非酶管 | 酶管 |
|---|------|------|------|------|
| GSH 标准品溶剂应用液 (mL) | 1 | -- | -- | -- |
| 20 μmol/L GSH 标准液 (mL) | -- | 1 | -- | -- |
| 上清液 (mL) | -- | -- | 1 | 1 |
| 试剂三应用液 (mL) | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 试剂四 (mL) | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| 试剂五应用液 (mL) | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| 混匀, 室温静置 15 min, 412 nm, 1cm 光径石英比色皿, 双蒸水调零, 测其吸光度。 | | | | |

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

血清（浆）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。

$$\text{GSH-Px 活力 (U)} = \frac{\Delta A_1}{\Delta A_2} \times c \times f_1 \times f$$

组织及细胞的结果计算：

定义：规定每毫克蛋白在 37°C 反应 5 min，扣除非酶反应的作用，使反应体系中 GSH 浓度降低 1 $\mu\text{mol/L}$ 为一个酶活单位。

$$\text{GSH-Px 活力 (U/mgprot)} = \frac{\Delta A_1}{\Delta A_2} \times c \times f_2 \times f \div (V \times C_{\text{pr}})$$

培养液的结果计算：

定义：规定每 0.1 mL 细胞上清在 37°C 反应 5 min，扣除非酶反应的作用，使反应体系中 GSH 浓度降低 1 $\mu\text{mol/L}$ 为一个酶活单位。

$$\text{GSH-Px 活力 (U)} = \frac{\Delta A_1}{\Delta A_2} \times c \times f_2 \times f \div 2^*$$

注解:

ΔA_1 : 样本的绝对 OD 值 (非酶管 OD 值-酶管 OD 值)

ΔA_2 : 标准品的绝对 OD 值 (标准品 OD 值-空白管 OD 值)

c: 标准品浓度 (20 $\mu\text{mol/L}$)

f: 样本加入检测体系之前的稀释倍数

f_1 : 稀释倍数 (6 倍), 酶促反应表中看出反应液 0.4 mL, 加试剂二 2 mL, 在反应液中为 6 倍稀释。

f_2 : 稀释倍数 (5 倍), 从酶促反应表中可看出反应液为 0.5 mL, 加入试剂二 2 mL, 在反应液中为 5 倍稀释。

*: 酶活定义为 0.1 mL 培养上清中的酶活, 测试用量为 0.2 mL, 故要除以 2。

V: 加样量 (mL)

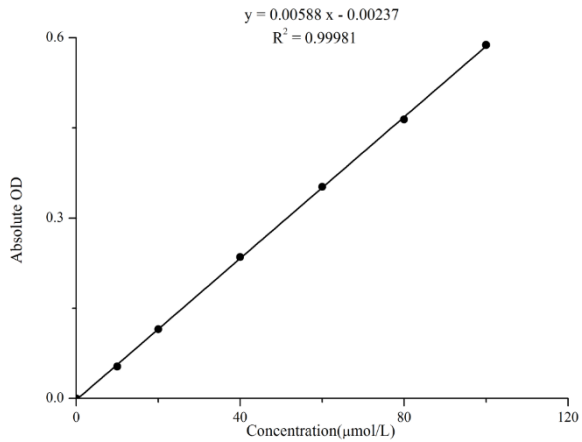
C_{pr} : 样本的蛋白浓度 (mgprot/mL)

附录1 关键数据

1. 技术参数

| | | | |
|-------|-------------|-------|------|
| 检测范围 | 12.65-387 U | 平均批间差 | 9.3% |
| 灵敏度 | 12.65 U | 平均批内差 | 4.9% |
| 平均回收率 | 105% | | |

2. 标准曲线(数据仅供参考)



附录2 实例分析

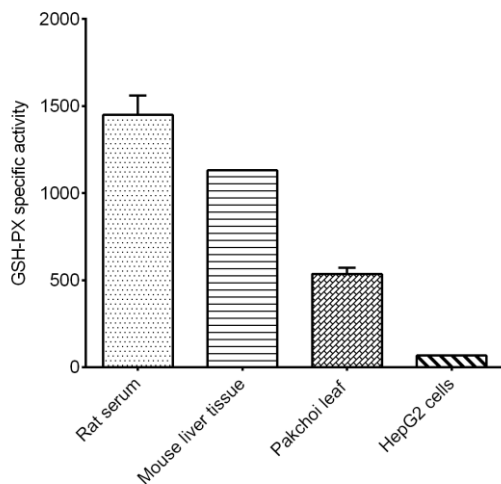
例如检测白菜叶子组织(数据仅供参考):

取2%的白菜叶子组织上清0.2 mL, 按操作表操作, 结果如下: :

空白管OD值为0.043, 标准管OD值为0.154, 非酶管OD值为0.461, 酶管OD值为0.277, 标准管浓度为20 $\mu\text{mol/L}$, 同时测得2%匀浆蛋白浓度为1.56 mg/mL, 计算结果为:

$$\text{GSH-Px活力 (U/mgprot)} = \frac{0.461-0.277}{0.154-0.043} \times 20 \times 5 \div (0.2 \times 1.556) = 533 \text{ U/mgprot}$$

按照说明书操作, 测定大鼠血清(稀释8倍, 加样量0.1 mL)和小鼠肝脏组织(5%组织匀浆的蛋白含量8.34 mg/mL, 稀释10倍, 加样量0.2 mL)、白菜叶子(2%组织匀浆的蛋白含量1.56 mg/mL, 加样量0.2 mL)和HepG2细胞(蛋白含量3.26 mg/mL, 加样量0.2 mL)中GSH-Px活力(如图):



附录3 问题答疑

| 问题 | 可能原因 | 建议解决方案 |
|---------|-----------------|-------------------|
| 复孔差异大 | 微量移液器使用不熟练 | 小心加样,避免液体溅到其它测样管中 |
| 样本测不出酶活 | 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 |

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. 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 nanoplatform 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

11. Wang H, Huang Q, Zhang Z, et al. Transient post-operative overexpression of CXCR2 on monocytes of traumatic brain injury patients drives monocyte chemotaxis toward cerebrospinal fluid and enhances monocyte-mediated immunogenic cell death of neurons in vitro[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2022. IF:7.573
12. Liu P, Yin Z, Chen M, et al. Cytotoxicity of adducts formed between quercetin and methylglyoxal in PC-12 cells[J]. *Food Chemistry*, 2021, 352(2):129424. IF:7.514
13. Adhikari B, Adhikari M, Ghimire B, et al. Cold plasma seed priming modulates growth, redox homeostasis and stress response by inducing reactive species in tomato (*Solanum lycopersicum*)[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2020, 156: 57-69. IF:7.376
14. Zhao X, Wang C, Dai S, et al. Quercetin Protects Ethanol-Induced Hepatocyte Pyroptosis via Scavenging Mitochondrial ROS and Promoting PGC-1 α -Regulated Mitochondrial Homeostasis in L02 Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:4591134. IF:7.31
15. Chagas TQ, Freitas ÍN, Montalvão MF, Nobrega RH, Machado MRF, Charlie-Silva I, Araújo APDC, Guimarães ATB, Alvarez TGDS, Malafaia G. Multiple endpoints of polylactic acid biomicroplastic toxicity in adult zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Chemosphere*. 2021 Aug;277:130279. IF:7.086
16. Mlindeli Gamede, Lindokuhle Mabuza, Phikelelani Ngubane, et al. Preventing the onset of diabetes-induced chronic kidney disease during prediabetes: The effects of oleanolic acid on selected markers of chronic kidney disease in a diet-induced prediabetic rat model[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021 Jul;139:111570. IF:6.529
17. Yang H, Zhu Y, Ye Y, et al. Nitric oxide protects against cochlear hair cell damage and noise-induced hearing loss through glucose metabolic reprogramming.[J]. *Free radical biology & medicine*, 2021. IF:6.525
18. Rao M J, Xu Y, Tang X, et al. CsCYT75B1, a Citrus CYTOCHROME P450 Gene, Is Involved in Accumulation of Antioxidant Flavonoids and Induces Drought Tolerance in Transgenic Arabidopsis[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2020, 9(2):161. IF:6.313
19. Liou G G, Hsieh C C, Lee Y J, et al. N-Acetyl Cysteine Overdose Inducing Hepatic Steatosis and Systemic Inflammation in Both Propacetamol-Induced Hepatotoxic and Normal Mice[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(3):442. IF:6.312
20. Wang Y, Chi H, Xu F, et al. Cadmium chloride-induced apoptosis of HK-2 cells via interfering with mitochondrial respiratory chain[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 236:113494-. IF:6.233
21. Obaid QA, Al-Shammari AM, Khudair KK. Glucose Deprivation Induced by Acarbose

- and Oncolytic Newcastle Disease Virus Promote Metabolic Oxidative Stress and Cell Death in a Breast Cancer Model. *Front Mol Biosci.* 2022;9:816510. IF:6.113
22. Abdel-Wahab BA, Walbi IA, Albarqi HA, Ali FEM, Hassanein EHM. Roflumilast protects from cisplatin-induced testicular toxicity in male rats and enhances its cytotoxicity in prostate cancer cell line. Role of NF- κ B-p65, cAMP/PKA and Nrf2/HO-1, NQO1 signaling[J]. *Food Chem Toxicol.* 2021 May;151:112133. IF:6.023
 23. Aljutaily T. Evaluating the Nutritional and Immune Potentiating Characteristics of Unfermented and Fermented Turmeric Camel Milk in Cyclophosphamide-Induced Immunosuppression in Rats. *Antioxidants (Basel).* 2022;11 (4):. IF:5.952
 24. Jabbari N, Nawaz M, Rezaie J. Ionizing Radiation Increases the Activity of Exosomal Secretory Pathway in MCF-7 Human Breast Cancer Cells: A Possible Way to Communicate Resistance against Radiotherapy[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(15):3649-. IF:5.923
 25. Shanmugarajan D, Girish C, Harivenkatesh N, et al. Antihypertensive and pleiotropic effects of *Phyllanthus emblica* extract as an add-on therapy in patients with essential hypertension—A randomized double-blind placebo-controlled trial[J]. *Phytotherapy Research*, 2021. IF:5.878
 26. Short-Chain Fatty Acid, Sodium Propionate, in Patients on Maintenance Hemodialysis: Beneficial Effects on Inflammatory Parameters and Gut-Derived Uremic Toxins, A Pilot Study (PLAN Study)[J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2018. IF:5.688
 27. Peng J, Pan J, Mo J, et al. MPO/HOCl Facilitates Apoptosis and Ferroptosis in the SOD1 G93A Motor Neuron of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2022;2022:8217663. IF:5.604
 28. Treadmill Exercise Alleviates Brain Iron Dyshomeostasis Accelerating Neuronal Amyloid- β Production, Neuronal Cell Death, and Cognitive Impairment in Transgenic Mice Model of Alzheimer's Disease[J]. *Molecular neurobiology*, 2021, 58(7):3208-3223. IF:5.59
 29. Aboulhoda, B. E., Rashed, L. A., Ahmed, H., et al. Hydrogen sulfide and mesenchymal stem cells-extracted microvesicles attenuate LPS-induced Alzheimer's disease[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2021, 236(8):5994-6010 IF:5.546
 30. Liu W, Jia H, Guan M, et al. Discovery of novel tubulin inhibitors targeting the colchicine binding site via virtual screening, structural optimization and antitumor evaluation. *Bioorg Chem.* 2022;118:105486. IF:5.508