（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 H2O 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。

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

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

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℃ 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℃ 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	磷酸盐 (Phosphate)	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃ 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℃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℃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℃ 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	GSH 标准品溶剂贮备液 (GSH Standard Stock Diluent)	3 mL×1 瓶	6 mL×1 瓶	2-8℃ 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-可见光分光光度计（412 nm）、37℃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 μL，200 μL，10 μL ）、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 10^6 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：

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

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℃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℃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℃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℃预温 5 min （试剂一应用液 37℃预温 5 min ）		
试剂一应用液（mL）	0.1	0.1
37℃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℃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。

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

组织及细胞的结果计算：

定义：规定每毫克蛋白在 37℃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 μmol/L 为一个酶活单位。

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

培养液的结果计算：

定义：规定每 0.1 mL 细胞上清在 37℃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 μmol/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 μmol/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）

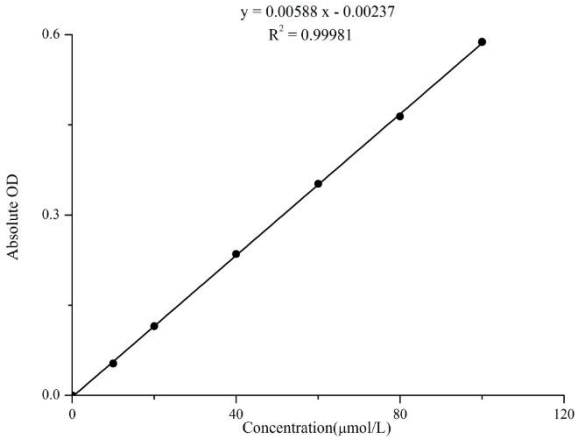
C_{pr}：样本的蛋白浓度（mgprot/mL）

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

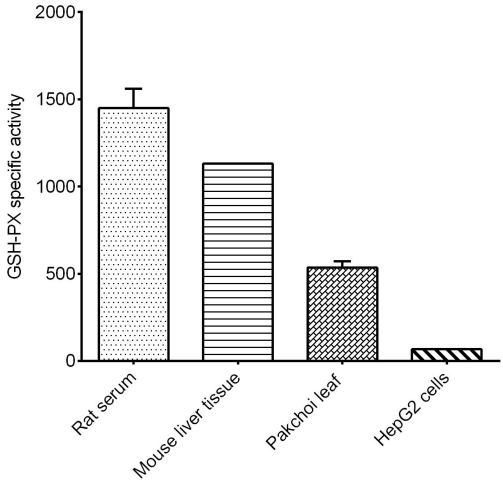
例如检测白菜叶子组织(数据仅供参考):

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 μmol/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. Feng R, Chen L, Yang M. Aluminum-induced oxidative stress promotes changes in the structure of the gut microbiota and liver deficiency[J]. Heliyon, 2024, 10(16).

2. Liu Y, Zhang L, Zhao J, et al. Effective-Component Compatibility of Bufei Yishen Formula III Suppresses Mitochondrial Oxidative Damage in COPD: Via Pkm2/Nrf2 Pathway[J]. International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, 2024: 1905-1920.

3. Arulraj K, Quadri J A, Nayak B, et al. Impact of heavy metals, oxidative stress, expression of VHL, and antioxidant genes in the pathogenesis of renal cell carcinoma[C]//Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations. Elsevier, 2025, 43(1): 66. e19-66. e28.