谷胱甘肽过氧化物酶（GPX）检测试剂盒（DTNB 法/微量法）

货　　号：PMK1962BKM
规　　格：48T/24S 96T/48S
检测方法：比色法
储存条件：4℃避光保存 12 个月

建议正式实验前，选取 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验，如果样本吸光值不在检测范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

一、产品简介

研究背景：谷胱甘肽过氧化物酶（GPX）是谷胱甘肽氧化还原循环中催化还原型谷胱甘肽（GSH）氧化的主要酶之一。GPX 不仅能够特异地催化还原型谷胱甘肽与活性氧（ROS）反应，生成氧化型谷胱甘肽 GSSG，从而保护生物膜免受 ROS 的损害，维持细胞的正常功能；而且具有保护肝脏、提高机体免疫力、拮抗有害金属离子对机体的伤害和增加机体抗辐射等能力。GPX 的活性中心是硒半胱氨酸，硒是 GPX 的必需部分，测定 GPX 的活力可以作为衡量机体硒水平的一项生化指标。

检测原理：本试剂盒提供了一种简单易用的比色法，用于分析各种生物样品中 GPX 的活性。其原理是谷胱甘肽过氧化物酶可催化 H_2O_2 氧化 GSH 生成 GSSG，GSH 和 5,5'-二硫代-双-（2-硝基苯甲酸）（5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenoicacid，DTNB）反应生成黄色的 2-硝基-5-巯基苯甲酸，产物在 412 nm 处有特征吸收峰，通过吸光值下降速率即可表征谷胱甘肽过氧化物酶活性。

检测意义：评估机体抗氧化能力、筛查硒缺乏、监测氧化应激相关疾病的进程。

适用样本：动物组织、细胞、细菌、血清、血浆、培养液等液体样本。

二、产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
试剂一	60mL	120mL	4℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃保存
试剂三	100μL	200μL	4℃避光保存
试剂四	10mL	20mL	4℃保存
试剂五	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	4℃避光保存
标准品	粉剂×1 支	粉剂×2 支	4℃避光保存

三、需自备的仪器和用品

酶标仪或可见光分光光度计（能测 412nm 处的吸光度）及水浴锅、96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头、离心机、制冰机、去离子水、匀浆器。（如果是组织样本）

四、试剂准备

试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂二：临用前每瓶加入 20mL 试剂一，充分溶解备用；用不完的试剂分装-20℃保存。

试剂三：使用前按吸取试剂三 4.3μL 加入 5mL 去离子水的比例，充分混匀，临用前配制，配制好的试剂当天使用；4℃避光保存。

试剂四：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂五：临用前每瓶加入 2.5mL 去离子水溶解；4℃避光保存。

50mM GSH 标准品：每管 GSH 标准品含 15.4mg GSH，使用时加 1mL 去离子水得 50mM GSH 标准品，用不完的试剂分装-20℃保存。

2000μM GSH 标准品：取 40μL 50mM GSH 标准品用 960μL 去离子水稀释。

标准曲线设置： 使用 2000μM GSH 标准品，按照下表所示，进一步稀释标准品：

	标准品体积（μL）	去离子水体积（μL）	标准品浓度(μM)
Std.1	200μL 2000μM	0	2000
Std.2	100μL of Std.1（2000μM）	100	1000
Std.3	100μL of Std.2 （1000μM）	100	500
Std.4	100μL of Std.3（500μM）	100	250
Std.5	100μL of Std.4（250μM）	100	125
Std.6	100μL of Std.5（125μM）	100	62.5
Std.7	100μL of Std.6（62.5μM）	100	31.25

⚠ **注意：每次实验，请使用新配制的标准品。**

五、样本制备

动物组织：称取 0.1g 组织样本，加入 1mL 预冷的试剂一，快速冰上匀浆。匀浆后的样本，8,000g，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

细胞或细菌：收集 500 万细胞或细菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞或细菌，离心后弃上清，加入 1mL 预冷的试剂一，冰浴超声波破碎细胞或细菌 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），然后 8,000g，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

血清（浆）：直接测定（如需要可用生理盐水稀释不同倍数）。

⚠ **注意：**

1.推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月，样品处理等过程均需要在冰上进行，且须在当日测定酶活力，匀浆液避免反复冻融。

2.细胞中 GPX 活性

测定时，细胞数目须在 3~5×10^6 之间，细胞中 GPX 的提取时可加试剂一后匀浆或超声波处理，不能用细胞裂解液处理细胞。

3.如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 法蛋白质定量试剂盒，进行样本蛋白质浓度测定。

六、实验步骤

1. 酶标仪或可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 412nm，可见分光光度计去离子水调零。
2. 溶解后的试剂二和稀释后的试剂三置于 37℃中预热 15min。
3. 样本测定：在 EP 管中依次加入下列试剂

	标准（μL）	空白（μL）	测定（μL）	对照（μL）
标准品	20	0	0	0

去离子水	0	20	0	0
样本	0	0	20	0
试剂一	180	180	0	0
试剂二	0	0	160	160
试剂三	0	0	20	20
迅速混匀，放入 37℃准确孵育 5min				
样本	0	0	0	20

充分混匀，取反应液 100uL 加入 96 孔板或微量玻璃比色皿中：

	标准（μL）	空白（μL）	测定（μL）	对照（μL）
反应液	100	100	100	100
试剂四	80	80	80	80
试剂五	20	20	20	20

充分混匀，37℃避光孵育 10min,记录 10min 时 412nm 处的吸光度 A，计算$\Delta A_{测定}=A_{对照}-A_{测定}$，$\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{空白}$。每个测定管需设一个对照，空白和标准曲线只需要测一次。

⚠ **注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果$\Delta A_{测定}$小于 0.001 可适当加大样本量。如果$\Delta A_{测定}$大于 0.8，样本可用试剂一进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数。如果$\Delta A_{测定}$为负值或结果不稳定，而且测定和对照值都较高，可能是样本基质干扰，样本可用试剂一进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数。对于肝、肾等蛋白含量较高、酶活较强的动物组织，匀浆上清可先尝试 2–5 倍稀释进行预实验。**

七、结果计算

1. 标准曲线的绘制：

以标准品浓度为 y 轴，$\Delta A_{标准}$为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。将$\Delta A_{测定}$带入方程计算出 y 值（1μM=1nmol/mL）。

2. 样本 GPX 活性计算

（1）按样本质量计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟催化 1nmolGSH 氧化定义为一个酶活性单位 U。

GPX 活性(U/g 质量) = $(y\times V_{反总})\div(W\times V_{样}\div V_{样总})\div T\times n=2\times y\div W\times n$

（2）按液体样本体积计算

单位的定义：每 mL 液体样本在反应体系中每分钟催化 1nmolGSH 氧化定义为一个酶活性单位 U。

GPX 活性(U/mL) = $(y\times V_{反总})\div V_{样}\div T\times n=2\times y\times n$

（3）按细菌或细胞数量计算

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟催化 1nmolGSH 氧化定义为一个酶活力单位 U。

GPX 活性(U/10^4 cell)= $(y\times V_{反总})\div(500\times V_{样}\div V_{样总})\div T\times n=0.004\times y\times n$

（4）按蛋白浓度计算

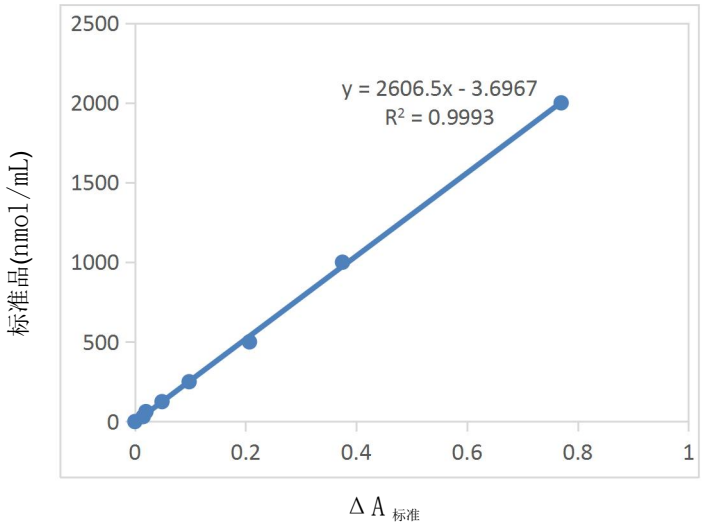
单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化 1nmolGSH 氧化定义为一个酶活力单位 U。

GPX 活性（U/mg prot）=$(y\times V_{反总})\div(Cpr\times V_{样})\div T\times n=2\times y\div Cpr\times n$

$V_{反总}$：反应体系总体积，0.2mL；W：样本质量，g；$V_{样}$：加入样本体积，0.02mL；$V_{样总}$：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，5min；n：样本稀释倍数；500：细胞或细菌总数，500 万；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL。

结果展示

典型标准曲线



附录：常见问题与解决方案（FAQ）

问题	解决措施
计算时如果选择合适的计算公式？	动物组织及细胞微生物等，可以用质量或者细胞数量计算，也可以建议测蛋白浓度
	植物可建议用质量计算，也可以建议测蛋白
	血液或是其他液态样品，可建议用体积计算
	如客户要购买蛋白含量测定试剂盒，除了说明书强调用考马斯亮蓝法的，通常建议 BCA 法。动植物组织因为蛋白含量高，在 10mg/ml 左右，如果用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度的话通常需要用 PBS 缓冲液等稀释液进行稀释。
测定时如何进行调零？	除说明书中提示用对照管或某种试剂调零外，都用纯水调零。
试剂盒中样本提取时需要 0.1g 组织，我的样品量不够怎么办？	通常可以按比例缩小，如说明书中是约 0.1g 组织加 1ml 提取液，可以等比例缩小，如 0.05g 组织加 0.5ml 提取液提取。后续操作不变。
	对于数量少的样品，一方面可以减少提取液体积，另一方面还可以延长反应时间。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1023BKM 还原型谷胱甘肽（GSH）检测试剂盒（微量法）

PMK1024BKM 氧化型谷胱甘肽（GSSG）检测试剂盒（微量法）

PMK1022BKM 谷胱甘肽还原酶（GR）检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：