

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

谷胱甘肽过氧化物酶活性测定试剂盒(NADPH 法)
Glutathione Peroxidase (GSH-Px)
Activity Assay Kit (NADPH Method)

产品货号: BC00012

产品规格: 100T

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:

✉ 邮箱 (销售) order@enkilife.cn

✉ 邮箱 (技术支持) tech@enkilife.cn

☎ 公司电话 027-87002838

🌐 网址 www.enkilife.cn



订阅微信公众号
获取更多技术
信息及前沿动态

保质期: 请见试剂盒外包装标签。

技术支持: 为了更好地给您提供服务, 联系时请告知产品外包装标签上批号。

基本信息

产品中文名称	谷胱甘肽过氧化物酶活性测定试剂盒(NADPH 法)
产品英文名称	Glutathione Peroxidase (GSH-Px) Activity Assay Kit (NADPH Method)
检测方法	Colorimetric
样品类型	组织、细胞
检测类型	Enzyme activity
检测仪器及波长	酶标仪 (340 nm)

产品简介

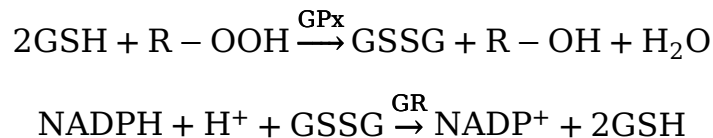
谷胱甘肽过氧化物酶检测试剂盒(NADPH 法)是一种常用的生化试剂盒，用于检测谷胱甘肽过氧化物酶（GPx）的活性。GPx 是一种重要的抗氧化酶，能够清除人体内的过氧化氢等有害物质，在保护细胞免受自由基损伤，维护细胞内环境的稳定性。细胞内的脂类容易和自由基发生反应，产生脂类过氧化物。谷胱甘肽过氧化物酶可以利用还原型谷胱甘肽(GSH)还原脂类过氧化物，从而消除自由基的毒害作用。谷胱甘肽过氧化物酶几乎在所有组织中都有分布。在一些病理状况下谷胱甘肽过氧化物酶的活力会发生明显上调或下调。

产品特点

- ★ 本试剂盒提供的有机过氧化物试剂（t-Bu-OOH）在没有谷胱甘肽过氧化物酶存在的情况下不会和 GSH 产生反应，也不会被细胞内的过氧化氢酶催化而分解。因而可以较为特异地检测出谷胱甘肽过氧化物酶的活力。
- ★ 由于 t-Bu-OOH 不能被不含硒的谷胱甘肽过氧化物酶所催化，所以本试剂盒可以比较特异地定量检测最常见的含硒的谷胱甘肽过氧化物酶。

检测原理

GPx 催化还原型谷胱甘肽（GSH）与过氧化物试剂（R-OOH）反应，转化为氧化型谷胱甘肽（GSSG）。谷胱甘肽还原酶（GR）可以利用 NADPH 催化 GSSG 产生 GSH。在上述反应中，谷胱甘肽过氧化物酶是整个反应体系的限速步骤，因此 NADPH 的减少量和谷胱甘肽过氧化物酶的活力线性相关。因此通过检测 A340 的变化，反应 NADPH 减少的量，即可计算 GPx 的活力水平。



产品组分

产品名称	包装规格 (100T)	保存方式
样品匀浆液	100ml	-20℃
谷胱甘肽过氧化物酶检测缓冲液	50ml	-20℃
谷胱甘肽还原酶	100μl	-20℃
NADPH	11.5mg	-20℃, NADPH 溶解后, 分装-70℃ 保存, 4℃ 可以保存一天, -20℃ 保存一周后 NADPH 会降解 10% 以上
还原型谷胱甘肽(GSH)	10mg	-20℃, GSH 配制成溶液, 分装后-20℃ 保存
过氧化物试剂(t-Bu-OOH)	200μl	-20℃
96 孔酶标板	1 板	RT
96 孔覆膜	2 张	RT

保存条件

未拆封的试剂盒可在 -20℃保存 12 个月。

实验前准备

• 样品处理

- 细胞样品的准备：细胞样品对于贴壁细胞，由于后续用于酶活性的测定，应避免使用胰酶消化细胞。可以使用 EDTA 处理细胞或用细胞铲或细胞刮收集细胞。细胞用 PBS 或生理盐水洗涤一遍。后续 a 和 b 步骤可以任选其一(优先推荐步骤 a)：
 - 可以用 EnkiLife 生产的 Western 及 IP 细胞裂解液(RC0009)参考相应说明裂解细胞样品。按照每 100 万细胞加入 100-200 微升裂解液的比例进行裂解。如果出现裂解效果不佳的情况，可以把处在裂解液中的细胞样品用玻璃匀浆器在 4℃ 或冰浴匀浆。随后 4℃，

12,000g 离心 10 分钟。取上清用于酶活性的测定。

- b. 可以用本试剂盒中的样品匀浆液，按照每 100 万细胞加入 100-200 微升样品匀浆液的比例用玻璃匀浆器在 4°C 或冰浴匀浆。随后 4°C，12,000g 离心 10 分钟。取上清用于酶活性的测定。
2. 组织样品的准备：动物用含有 0.16mg/ml heparin 的生理盐水(0.9% NaCl containing 0.16mg/ml heparin)灌流清除血液后获取组织样品。按照约每 20mg 组织加入 200 微升样品匀浆液的比例，用组织研磨仪或玻璃匀浆器在 4°C 或冰浴匀浆。4°C，12,000g 离心 10 分钟。取上清用于酶活性的测定。
3. 红细胞裂解液的准备：用抗凝管收集血液，颠倒混匀。取至少 500 微升全血 4°C 2500g 离心 5 分钟。弃上清，用冰冷的约红细胞沉淀 10 倍体积的样品匀浆液重悬沉淀，再同前离心，弃上清。加入约红细胞沉淀 4 倍体积的冰冷的 Milli-Q 级纯水裂解红细胞。12,000g 离心 5 分钟，取上清。
4. 样品稀释：在正式检测前，需选择差异较大的 2-3 个样本稀释成不同浓度进行预实验，如果发现样品中谷胱甘肽过氧化物酶的活力过高，可以用谷胱甘肽过氧化物酶检测缓冲液进行稀释。如果样品中谷胱甘肽过氧化物酶的活力过低，则需适当加大蛋白用量。
5. 蛋白浓度测定：上述各种样品可以用 EnkiLife 生产的蛋白浓度测定试剂盒(BCA 法)(BC00006)测定蛋白浓度。通常可以先取含 1-100 微克蛋白的样品用于谷胱甘肽过氧化物酶的检测。注：对于 GPx 活力较高的组织样品，含 1-10 微克蛋白的样品可能就能满足检测需求，而对于 GPx 活力较低的样品例如某些细胞样品，可能需要 10-100 微克的蛋白量。

• 试剂盒的准备工作

1. 62.5mM NADPH 溶液的配制

在本试剂盒提供的 11.5mg NADPH 中加入 220 微升 Milli-Q 级纯水，溶解并混匀，即为 62.5mM NADPH 溶液。除立即待用部分外，其余的 NADPH 溶液需适当分装后-70 °C 保存。

2. 75mM GSH 溶液的配制

在本试剂盒提供的 10mg GSH 中加入 433 微升 Milli-Q 级纯水，溶解并混匀，即为 75mM GSH 溶液。除立即待用部分外，其余的 GSH 溶液需适当分装后-20℃ 保存。

3. GPx 检测工作液的配制

根据待测定的样品数(含对照)，按照每个检测需要 40 微升 GPx 检测工作液的体积配制适量的 GPx 检测工作液。配制好的 GPx 检测工作液仅限当日使用，且需尽量在冰浴上存放。具体配制方法参考下表。

可测定样品数(含对照)	1 个样品	10 个样品	20 个样品
谷胱甘肽过氧化物酶检测缓冲液	35μl	350μl	700μl
62.5mM NADPH	2μl	20μl	40μl
75mM GSH	2μl	20μl	40μl
谷胱甘肽还原酶	1μl	10μl	20μl
GPx 检测工作液	40μl	400μl	800μl

4. 30mM 过氧化物试剂溶液的配制

取 21.5 微升过氧化物试剂(t-Bu-OOH)加入 5 毫升 Milli-Q 级纯水，混匀，即配制成 30mM 过氧化物试剂溶液。配制好的 30mM 过氧化物试剂溶液仅限当日使用，且需尽量在冰浴上存放。

5. 所有试剂使用前须在水浴中或 PCR 仪等设备上温育到 25℃。

操作流程

1. 参考下表，使用 96 孔板，依次加入检测缓冲液、待测样品和 GPx 检测工作液，混匀，加入 40 微升 GPx 检测工作液后，室温孵育 15 分钟，以消耗掉样品中的 GSSG，排除对后继检测的干扰。

	空白对照(blank)	样品(sample)
谷胱甘肽过氧化物酶检测缓冲液	50μl	0-50μl
待测样品	——	0-50μl
GPx 检测工作液	40μl	40μl
总体积	90μl	90μl

2. 每孔加入 10 微升 30mM 过氧化物试剂溶液，混匀。
3. 立即使用适当的酶标仪或微量紫外分光光度计测定 A340，此时记录为 0 分钟读值。如果仪器可以设置温度，把温度设置在 25°C，否则可以通过空调调节室温到 25°C，待预计仪器也达到 25°C 后再开始测定 A340。
4. 连续测定 5 分钟或自动每隔 1 分钟测定一次 A340。如果仪器不具备相应功能，可以手工操作，每隔 1 分钟记录 A340 值，至少连续记录 5 分钟，获得 6 个点的数据。

注 1：连续测定的时间可以根据样品中 GPx 的活力来调整，但是需确保获得 6 个点的数据。对于 GPx 的活力较高的样品，建议测定 5 分钟或 10 分钟，对应的测定间隔时间设为 1 分钟和 2 分钟；对于 GPx 的活力很低的样品，可以延长测定时间为 10、15 或者 20 分钟，对应的测定间隔时间设为 2、3 或 4 分钟。也可以连续测定 20 分钟，每隔 1 分钟测定 1 次，最后取呈线性的时间点前的数据用于分析。

注 2：如果样品的第一次读数比如 0 分钟时 A340 读值低于 1，说明样品中的 GPx 活力太高，或者样品中本身的 GSSG 含量太高，需要将样品适当稀释或者减少样品的用量。

5. 测定出来的 $\Delta A340/min$ 最好能控制在 0.01-0.2 范围内。如测定出来的 $\Delta A340/min$ 数值过大，则可以把样品适当稀释或者减小样品的用量，如 $\Delta A340/min$ 数值过小，处理样品时需设法尽量浓缩样品、并适当加大样品的用量。如表 1、图 1、表 2、图 2。

表 1. 高蛋白浓度鱼肉组织样品检测数据分析

读值	0min	1min	2min	3min	4min	5min
A340 (blank)	1.6789	1.6585	1.6384	1.6187	1.5990	1.5794
A340 (sample)	1.0408	0.9172	0.7775	0.6482	0.5274	0.4163
$\Delta A340$ (blank)	0.0000	0.0204	0.0405	0.0602	0.0799	0.0995
$\Delta A340$ (sample)	0.0000	0.1236	0.2633	0.3926	0.5134	0.6245
$\Delta A340$	0.0000	0.1032	0.2228	0.3324	0.4335	0.5250
$\Delta A340/min$	0.0000	0.1032	0.1114	0.1108	0.108375	0.105

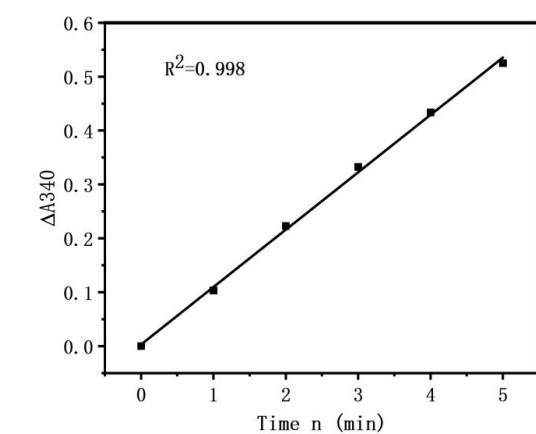


图 1. 高蛋白浓度鱼肉组织样品测定 5min 的检测效果

表 2. 低蛋白浓度鱼肉组织样品检测数据分析

读值	0min	3min	6min	9min	12min	15min
A340 (blank)	1.7105	1.6790	1.6549	1.6327	1.6107	1.5902
A340 (sample)	1.1529	0.9996	0.8519	0.7161	0.5904	0.4738
△A340 (blank)	0	0.0315	0.0556	0.0778	0.0998	0.1203
△A340 (sample)	0	0.1533	0.301	0.4368	0.5625	0.6791
△A340	0.0000	0.1218	0.2454	0.3590	0.4627	0.5588
△A340/min	0.0000	0.0406	0.0409	0.0399	0.0386	0.0373

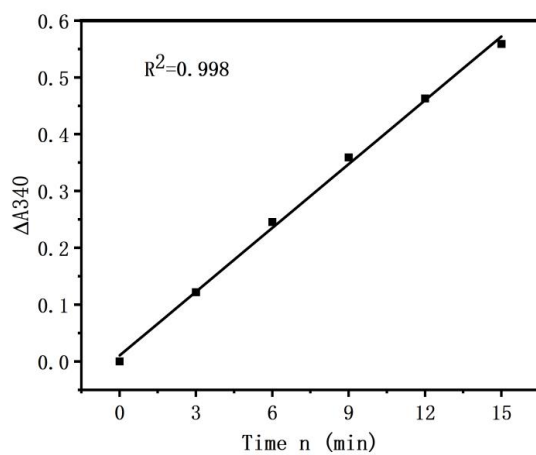


图 2. 低蛋白浓度鱼肉组织样品测定 15min 的检测效果

注: $\Delta A_{340}(\text{blank}) = A_{340}(\text{blank})(\text{Time } 0) - A_{340}(\text{blank})(\text{Time } n)$

$\Delta A_{340}(\text{sample}) = A_{340}(\text{sample})(\text{Time } 0) - A_{340}(\text{sample})(\text{Time } n)$

$\Delta A_{340} = \Delta A_{340}(\text{sample}) - A_{340}(\text{blank})$

$\Delta A_{340}/\text{min} = \Delta A_{340}/n$

结果计算

1. 谷胱甘肽过氧化物酶活力单位的定义

1 个酶活力单位(1 unit)在 25°C, pH8.0, 在 GSH、谷胱甘肽还原酶、t-Bu-OOH 存在的条件下, 在 1 分钟内可以催化 1 微摩尔 NADPH 转变成 NADP⁺。1 U=1000 mU。

2. 对于谷胱甘肽过氧化物酶溶液

$1\text{mU}/\text{ml} = 1\text{nmol NADPH}/\text{min}/\text{ml} = (\Delta A_{340}/\text{min})/(\epsilon^{\mu\text{M}} \times L(\text{cm}))$

3. 即相当于:

[检测体系中谷胱甘肽过氧化物酶活力] $= (\Delta A_{340}/\text{min})/(\epsilon^{\mu\text{M}} \times L(\text{cm})) = [(\Delta A_{340}(\text{sample}) - \Delta A_{340}(\text{blank}))/\text{min}]/(\epsilon^{\mu\text{M}} \times L(\text{cm}))$

[样品中谷胱甘肽过氧化物酶活力] = [检测体系中谷胱甘肽过氧化物酶活力] × [稀释倍数]/[样品中的蛋白浓度] $= [(\Delta A_{340}/\text{min})/(\epsilon^{\mu\text{M}} \times L(\text{cm}))] \times [\text{dil} \times (V(\text{ml})/V_{\text{sample}}(\text{ml}))]/[\text{样品中的蛋白浓度}]$

注: [检测体系中谷胱甘肽过氧化物酶活力]的单位为 mU/ml, [样品中的蛋白浓度]的单位为 mg/ml, 所以最终[样品中谷胱甘肽过氧化物酶活力]的单位为: U/mg 蛋白或 mU/mg 蛋白;

$\epsilon^{\mu\text{M}}$ 为摩尔消光系数: NADPH 在 A340 的摩尔消光系数为 $0.00622\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$;

$L(\text{cm})$ 为测吸光度时的路径长度: 100 μl 样品在一般的 96 孔中的高度约为 0.276cm, 如果使用不同的反应孔, 请注意修改为溶液在该孔中的高度;

dil 为样品的稀释倍数;

$V(\text{ml})$ 为反应体系, 本反应体系为 0.1ml;

$V_{\text{sample}}(\text{ml})$ 为反应体系中样品的体积, 以毫升表示。

4. 计算示例:

样品的蛋白浓度经测定为 1.2mg/ml，用样品稀释液稀释 2 倍后，取 20 微升稀释后的样品参考表 1 进行测定，测定时间设为 15 分钟。如果 0 分钟时的 A340 (sample)=1.53，A340 (blank)=1.75，15 分钟时的 A340 (sample) = 0.81，A340 (blank) = 1.35，则 Δ A340 (sample)=1.53-0.81=0.72， Δ A340 (blank)=1.75-1.35=0.40，那么：

$$\begin{aligned} \text{[检测体系中谷胱甘肽过氧化物酶活力]} &= [(0.72-0.40)/15]/(0.00622 \times 0.276) \\ &= 12.43 \text{mU/ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{[样品中谷胱甘肽过氧化物酶活力]} &= 12.43 \text{mU/ml} \times (2 \times 0.1 / 0.02) / (1.2 \text{mg/ml}) \\ &= 104 \text{mU/mg(蛋白)} \end{aligned}$$

注意事项

1. 本试剂盒检测时涉及氧化还原反应，因此所有氧化剂或还原剂都会干扰本试剂盒的测定。如果在样品中的还原剂无法避免，例如 DTT、巯基乙醇等，则这些还原剂的总浓度至少低于 0.1mM。0.15mM 的 DTT 可以抑制 40%的酶活力。
2. 常用的 Triton X-100、Tween-20 等去垢剂都含有较高水平的过氧化物，会影响本试剂盒的测定。如果必须使用这些去垢剂，最好使用纯度较高并注明含较低过氧化物的去垢剂。
3. 加入过氧化物试剂溶液后的第一次读数，例如 0 分钟时 A340 读值不宜低于 1。如果读数低于 1，说明样品中的 GPx 活力太高，或者样品中本身的 GSSG 含量太高，需要将样品适当稀释或者减少样品的用量，否则反应很快就进入平台期，无法获取正常的检测数据。样品可以立即测定，也可以-70℃ 冻存待以后测定。
4. 一定要严格控制反应时的温度为 25℃，否则会引起较多误差。
5. NADPH 不太稳定，要严格按照后续说明操作，谨防失活。
6. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。