**谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)测定含量试剂盒说明书（货号：PYB2052，规格：96T）**

1. **实验原理：**

谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-PX）可以促进过氧化氢（H2O2）与还原型谷胱甘肽（GSH）反应生成H2O及氧化型谷胱甘肽（GSSG），谷胱甘肽过氧化物酶的活力可用其酶促反应的速度来表示，测定此酶促反应中还原型谷胱甘肽的消耗，则可求出酶的活力。反应方程式为：H2O2+2GSH 2H2O+GSSG

GSH-PX

GSH-PX的活力以催化GSH的反应速度来表示，由于这二个底物在没有酶的条件下，也能进行氧化还原反应（称非酶促反应），所以最后计算此酶活力时必须扣除非酶促反应所引起的GSH减少的部分。

**二、试剂组份：**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 试剂编号 | 名称 | 50管/24样 | 100管/48样 | | 保存 |
| 试剂一 | 底物贮备液 | 1mL×1瓶 | 2mL×1瓶 | | 4℃ |
| 试剂一应用液的配制：用时取0.1mL加蒸馏水至10mL，也就等于是100倍稀释配成应用液，现用现配，也可按比例配制需多少配多少。 | | | | | |
| 试剂二 | 甲粉 | 1瓶 | | 1瓶 | 4℃ |
| 乙液 | 25mL×1瓶 | | 50mL×1瓶 | 4℃ |
| 应用液配制 | 每瓶甲粉加蒸馏水85mL(可多加3mL),高温加热至完全溶解，然后再与1瓶乙液混合 | | 每瓶甲粉加蒸馏水170mL(可多加5mL),高温加热至完全溶解，然后再与1瓶乙液混合 | 室温 |
| 试剂三 | 粉剂 | 1瓶 | | 1瓶 | 4℃ |
| 每瓶加蒸馏水100mL溶解 | | 每瓶加蒸馏水200mL溶解 |
| 试剂四 | 显色剂 | 液体25mL×1瓶 | | 粉剂×1支，用时加蒸馏水50mL溶解 | 4℃避光 |
| 试剂五 | 粉剂 | 2支 | | 4支 | 4℃避光 |
| 试剂五应用液的配制：每支加蒸馏水10mL溶解；4℃避光可保存五天。 | | | | | |
| 试剂六 | 标准品溶剂贮备液 | 5mL×1瓶 | | 10mL×1瓶 | 4℃ |
| 标准品溶剂应用液配制：用时按贮备液∶蒸馏水=1∶9（即10倍）稀释配成。 | | | | 4℃ |
| 试剂七 | GSH标准品 | 粉剂3.07mg×2支 | | 粉剂3.07mg×4支 | 4℃ |
| 1mmol/LGSH标准液配制：测定前将1支GSH标准品粉剂加到10mL标准品溶剂应用液中，充分溶解配成，配好后可4℃保存1-2周。 | | | | | |
| 100μmol/LGSH标准液配制：取1mmol/LGSH标准液1mL加标准品溶剂应用液9mL配成，做标准曲线用，若不做标准曲线可以不配。 | | | | | |
| 20μmol/LGSH标准液配制：取1mmol/LGSH溶液0.2mL加标准品溶剂应用液定容至10mL充分混匀配成，现用现配。 | | | | | |

注：试剂二甲液配置时**,**最好用能直接加热的设备**(**如电炉、酒精灯之类的**)**加热，不要用水浴锅加热；试剂二应用液配好后为过饱和溶液，室温静置冷却后，如有结晶，则取上清进行实验即可；试剂三溶解时也可以放在**37**℃环境中加速溶解。

预实验注意点：

注**1**：空白管、标准管一般只需做1—2只。酶管和非酶管每个样本都要做。

注**2**：最佳取样量及最佳取样浓度因样品种类不同，其GSH－PX活力不一，根据酶的百分抑制率与酶的活力呈抛物线关系，各种测定样品取样量及取样浓度不一样，在每测定一种新的样品前最好选择一个最佳取样量及最佳取样浓度。

1. **使用步骤：**

血清（浆）中GSH-PX活力的测定:

（1).酶促反应：(试剂一应用液提前5min在37ºC预温)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 非酶管 | 酶管 |
| 1mmol/LGSH标准液（mL） | 0.2 | 0.2 |
| 待测血清（浆）（mL） |  |  |
| 37ºC预温5分钟 | | |
| 试剂一应用液（mL） | 0.1 | 0.1 |
| 37ºC准确反应5分钟 | | |
| 试剂二应用液（mL） | 2 | 2 |
| 待测血清（浆）（mL） | 0.1 |  |
| 混匀，3500～4000转/分，离心10分钟，取上清1mL作显色反应 | | |

2).显色反应:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 空白管 | 标准管 | 非酶管 | 酶管 |
| 标准品溶剂应用液（mL） | 1.0 |  |  |  |
| 20μmol/LGSH标准液（mL） |  | 1.0 |  |  |
| 上清液（mL） |  |  | 1.0 | 1.0 |
| 试剂三应用液（mL） | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| 试剂四应用液（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分钟后，412nm处，  1cm光径，蒸馏水调零，测各管OD值 | | | | |

（2）血清中GSH-PX酶活力的计算：

定义：每毫升血清在37℃每分钟，扣除非酶促反应作用，使反应体系中GSH浓度降低1μmol/L为一个酶活力单位（U）。

计算公式：

A非酶管—A酶管

血清（血浆）GSH-PX活力（U/ml）= ×C标准×N÷V样÷T×N样

A标准管—A空白管

C标准：显色反应中的GSH标准液浓度，20μmol/L；

N：酶促反应体系稀释倍数，6（2.4mL/0.4mL，固定值）；

T：反应时间，5min；V样：样本取样量，0.1,mL；

N样：样本测试前稀释倍数。

（3）.血清（浆）的最佳取样浓度摸索举例：

1、样本来源：正常组大鼠眼眶取全血肝素抗凝取血浆。

2、样本前处理：用生理盐水将血浆按1︰1、1︰4、1︰7、1︰9、1︰14、1︰19稀释成一系列不同浓度的血浆，分别取不同浓度血浆0.1mL按血清/浆的测定操作表进行检测。

3、测定结果：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 空白管OD值 | | 0.041 | |
| 标准管OD值 | | 0.163 | |
| 样本浓度 | 酶管OD值 | 非酶管OD值 | 抑制率 |
| 1︰1 | 0.117 | 0.519 | 77.46% |
| 1︰4 | 0.283 | 0.520 | 45.58% |
| 1︰7 | 0.365 | 0.518 | 29.53% |
| 1︰9 | 0.397 | 0.518 | 23.36% |
| 1︰14 | 0.421 | 0.516 | 18.41% |
| 1︰19 | 0.442 | 0.517 | 14.51% |

4、结论：

从上面的数据统计可以看出，抑制率在45%～55%之间的最佳取样浓度为1︰4。即取1︰4稀释正常组大鼠血浆0.1mL进行GSH-PX正式检测。

组织、细胞、线粒体中GSH－PX活力的测定：

1）、样本前处理：

1、组织样本前处理：准确称取待测动物组织的重量，按重量（g）：体积(mL)=1:9的比例，加入9倍体积的生理盐水，低温（0-4℃）条件匀浆，3500转/分，离心10分钟，取上清液待测（制备好的匀浆上清液需要测定其蛋白浓度，蛋白测定试剂盒本公司有售）。

2、线粒体制备及前处理：取10%的组织匀浆5～10mL，以1000～2000r/min离心10分钟（用普通离心机或低温低速离心机），取上清液以8000～10000r/min（低温高速离心机）离心15分钟，沉淀物为线粒体（若不立即测定，可直接放-20℃或-80℃冰箱保存，3个月内可用）。往线粒体中加入0.2～0.3mL的匀浆介质（推荐0.1mol/LpH7～7.4的PBS或生理盐水），冰水浴条件下超声破碎(功率:300W,3～5秒/次,间隔30秒，重复3～5次)，制备好的匀浆液若比较均匀可不离心直接测定。也可采用裂解液裂解(推荐TritonX-100，1～2%浓度0.1mL,裂解30～40分钟),裂解好的液体可不离心直接测定（制备好的匀浆液需要测定其蛋白浓度，蛋白测定试剂盒本公司有售）。

3、细胞样本前处理：（贴壁细胞）用细胞刮配合等渗PBS刮下或用胰酶消化下来（消化后加入0.5-1mL等渗PBS冲洗），再将细胞悬液转移到另一离心管中，1000转/分，离心10分钟，弃上清液，留细胞沉淀；用等渗缓冲液清洗1～2次，同样1000转/分，离心10分钟，弃上清液，留细胞沉淀（若不立即测定，可直接放-20℃或-80℃冰箱保存，3个月内可用）；往细胞沉淀中加入0.2～0.3mL的匀浆介质（推荐0.1mol/LpH7～7.4的PBS或生理盐水）（加完匀浆介质后轻轻混匀细胞溶液，使其均匀，吸取少量进行细胞计数；若是破碎后可以测蛋白，则不用细胞计数），冰水浴条件下超声破碎(功率:300W,3～5秒/次,间隔30秒，重复3～5次)或手动匀浆，制备好的匀浆液若比较均匀可不离心直接测定。也可采用裂解液裂解(推荐TritonX-100，1～2%浓度0.1mL，裂解30～40分钟),裂解好的液体可不离心直接测定。[注]：建议细胞数在100万个以上（越多测定效果越好）。破碎好的液体可显微镜观察细胞是否破碎完全。

2）、-PX活力测定操作表：

1.酶促反应：(试剂一应用液提前5min在37ºC预温)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 非酶管 | 酶管 |
| 1mmol/LGSH（mL） | 0.2 | 0.2 |
| 待测匀浆（mL） |  |  |
| 37ºC预温5分钟 | | |
| 试剂一应用液（mL） | 0.1 | 0.1 |
| 37ºC准确反应5分钟 | | |
| 试剂二应用液（mL） | 2 | 2 |
| 待测匀浆（mL） | 0.2 |  |
| 混匀，3500～4000转/分，离心10分钟，取上清液1mL作显色反应 | | |

2.显色反应

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 空白管 | 标准管 | 非酶管 | 酶管 |
| 标准品溶剂应用液（mL） | 1.0 |  |  |  |
|  |  | 1.0 |  |  |
|  |  |  | 1.0 | 1.0 |
|  | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
|  | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
|  | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| 混匀，室温静置15分钟后，412nm，1cm  光径比色杯，蒸馏水调零，测各管OD值。 | | | | |

（3）、组织中GSH-PX活力的计算：

定义：每毫克蛋白质37℃每分钟扣除非酶反应的作用，使反应体系中GSH浓度降低1μmol/L为一个酶活力单位（U）。

A非酶管-A酶管

组织GSH-PX活力（U/mgprot）=

A标准管-A空白管

×C标准×N ÷T（V样×Cpr）

C标准：显色反应中的GSH标准液浓度，20μmol/L；N：酶促反应体系稀释倍数，5（2.5mL/0.5mL，固定值）；

T：酶促反应时间，5min；V样：酶促反应样本取样量，0.2mL；Cpr：匀浆液蛋白浓度，mgprot/mL（prot指蛋白）。

【注】：酶促反应体系如有改变，计算时实际的V样需乘以体系改变的系数（如酶促反应体系缩小2倍后，取样0.1mL，计算时V样应为0.1mL×2=0.2mL）。

（4）、组织匀浆的最佳取样浓度及最佳取样量的摸索举例：

1、样本来源：正常小鼠肝组织，加生理盐水制备成10%的肝匀浆上清待测。

2、样本前处理：用生理盐水将10%肝匀浆稀释成0.5%、0.4%、0.3%、0.25%、0.2%、0.1%、0.05%浓度，分别取0.2mL按组织的测定操作表进行检测。

3、测定结果：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 空白管OD值 | | 0.041 | |
| 标准管OD值 | | 0.163 | |
| 样本浓度 | 酶管OD值 | 非酶管OD值 | 绝对OD值 |
| 0.05% | 0.411 | 0.463 | 0.052 |
| 0.1% | 0.356 | 0.464 | 0.108 |
| 0.2% | 0.283 | 0.462 | 0.179 |
| 0.25% | 0.244 | 0.461 | 0.217 |
| 0.3% | 0.213 | 0.462 | 0.249 |
| 0.4% | 0.175 | 0.461 | 0.286 |
| 0.5% | 0.145 | 0.460 | 0.315 |
| 1.0% | 0.085 | 0.460 | 0.375 |

4、结论：

从上面的数据统计可以看出，0.25%的匀浆液非酶管OD值-酶管OD值为0.217。即取0.25%正常组小鼠肝组织匀浆0.2mL进行GSH—PX正式检测。

全血中**GSH-PX**活力的测定

1、样本的前处理：溶血液的配制

①、取人肝素抗凝全血20μL，以蒸馏水稀释至1mL，配成1∶49的溶血液；鼠血10μL加蒸馏水至1mL，配成1∶99的溶血液。充分混匀，放置5分钟直至使玻璃管中的溶血液对光呈完全透明状，方可进行检测。

②、已配好的溶血液中GSH-PX活力只能保持45～60分钟，天冷时可延迟至120分钟。如果当天来不及测定则以抗凝全血冰箱（4℃～8℃）保存，2～3天内酶活力变化不大。

【注1】请在正式实验前做预实验，详见溶血液最佳取样浓度及取样量的摸索举例；

【注2】测溶血液中GSH－PX含量要注意样品测试前红细胞一定要充分溶血。（以对光观察透亮为标准，若不透亮可以冻溶一次，但有部分大鼠及猪的红细胞是不可放置0℃以下，否则不易溶血，例如糖尿病大鼠和部分正常大鼠的红细胞冻后很难溶血。在做正式试验前最好先取1～2只样本做预试。）

2、全血中GSH-PX酶活力测定操作步骤：

1）酶促反应：(试剂一应用液提前在37ºC预温)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 非酶管 | 酶管 |
| 1mmol/LGSH标准液（mL） | 0.2 | 0.2 |
| 待测溶血液（mL） |  | 0.2 |
| 37ºC预温5分钟 | | |
| 试剂一应用液 | 0.1 | 0.1 |
| 37ºC准确反应5分钟 | | |
| 试剂二（mL） | 2 | 2 |
| 待测溶血液（mL） | 0.2 |  |
| 混匀，3500～4000转/分，离心10分钟，取上清1mL作显色反应 | | |

2）、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 |  |  |  |
| 20μmol/LGSH标准液（mL） |  | 1 |  |  |
| 上清液（mL） |  |  | 1 | 1 |
| 试剂三（mL） |  |  | 1 | 1 |
| 试剂四（mL） | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 试剂五应用液（mL） | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| 混匀，室温静置15分钟后，412nm，1cm光径  比色杯，蒸馏水调零，测各管OD值 | | | | |

3）、全血中GSH-PX活力的计算：

定义：每毫升全血在37℃每分钟扣除非酶促反应的作用，使反应体系中GSH浓度降低1μmol/L为一个酶活力单位（U）。计算公式：

全血中GSH-PX活力（U/mgprot）=

A非酶管-A酶管

×C标准×N ÷V样÷T×N样

A标准管—A空白

C标准：显色反应中的GSH标准液浓度，20μmol/L；N：酶促反应体系稀释倍数，5（2.5mL/0.5mL，固定值）；V样：酶促反应样本加入量，0.2mL；T：酶促反应时间，5min；N样：全血制备成溶血液过程中的稀释倍数。

4）、溶血液的最佳取样浓度摸索举例：

1、样本来源：正常组新鲜大鼠尾部肝素抗凝全血。

2、样本前处理：分别用蒸馏水将大鼠全血按1︰49、1︰59、1︰69、1︰79、1︰89、1︰99、1︰149、1︰199的比例稀释成不同浓度的溶血液，分别取0.2mL按全血的测定操作表进行检测。

3、测定结果：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 空白管OD值 | | 0.041 | |
| 标准管OD值 | | 0.163 | |
| 样本浓度 | 酶管OD值 | 非酶管OD值 | 抑制率 |
| 1︰49 | 0.096 | 0.452 | 78.76% |
| 1︰59 | 0.107 | 0.450 | 76.22% |
| 1︰69 | 0.118 | 0.452 | 73.89% |
| 1︰79 | 0.130 | 0.450 | 71.11% |
| 1︰89 | 0.144 | 0.450 | 68.00% |
| 1︰99 | 0.163 | 0.449 | 63.70% |
| 1︰149 | 0.231 | 0.450 | 48.67% |
| 1︰199 | 0.298 | 0.449 | 33.63% |

4、结论：

从上面的数据统计可以看出，抑制率在45%～55%之间的最佳取样浓度为1︰149。即取1︰149稀释的正常组小鼠尾全血0.2mL进行GSH-PX正式检测。

1. **注意事项：**
2. 溶血液在室温下1小时内活力不变，建议样品稀释后不超过1小时测试为宜。
3. 血样要新鲜，肝素抗凝后放冰箱4～8℃存放不要超过48小时。
4. 测溶血液中GPX活性要注意样品测试前红细胞一定要充分溶血。（以对光观察透亮为标准，若不透亮可以冻溶一次，但有部分大鼠及猪的红细胞是不可冻溶越冻越不破，最好先取1～2只样本做预试）。
5. 酶促反应离心后有悬浮物无法分离时，可加入0.1mL氯仿涡旋震荡30秒再离心。
6. 37℃水浴反应时间5分钟，记录反应时间要准确。
7. 有的样本酶管OD值和非酶管OD值接近，此为样本GPX活性较低的缘故（且计算结果误差会比较大），这种情况可考虑增加样本浓度或样本量以及延长反应时间来改善测试效果。
8. 样本匀浆上清液当天提取，当天测试。组织蛋白质的测定法有多种，可参考实验方法学部分，或购买本公司蛋白定量试剂盒。
9. 试剂二甲粉溶解时不要用隔水加热的方式（因受热较慢导致溶解困难），而是需要直接加热才行（如电炉或酒精灯等），且加热时不断搅拌。