

凯基谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 测试盒

说明书修改日期: 2017.10.18

Cat number: KGT014

Store at 4°C for for 6 months

For Research Use Only (科研专用)

一. 试剂盒说明

谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GSH-PX) 是机体内广泛存在的一种重要的催化过氧化氢分解的酶。它特异的催化还原型谷胱甘肽 (GSH) 对过氧化氢的还原反应, 可以起到保护细胞膜结构和功能的完整的作用。GSH-PX 的活性中心是硒半胱氨酸, 硒是 GSH-PX 的必须部分, 每克分子酶含 4 克原子硒。测定 GSH-PX 的活力可以作为衡量机体硒水平的一项生化指标。

谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 可以促进过氧化氢还原型谷胱甘肽(GSH)反应生成水及氧化型谷胱甘肽 (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。



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), 所以最后计算酶活力时必须扣除非酶促反应所引起的 GSH 减少的部分。

GSH 量的测定: GSH 和二硫代二硝基苯甲酸作用生成 5-硫代二硝基苯甲酸阴离子呈现较稳定的黄色, 在 412nm 处测其吸光度即可计算出 GSH 的量。

二. 试剂盒的组成和配制

25 Tests (50 Tubes)试剂盒的组成和保存:

试剂编号	名称	数量及保存条件
1	贮备液	1ml X 1 瓶, 4°C 保存 6 个月
2	甲粉	1 瓶, 4°C 保存 6 个月
	乙液	25ml X 1 瓶, 4°C 保存 6 个月
3	粉剂	1 瓶, 4°C 保存 6 个月
4	液体	25ml X 1 瓶, 4°C 避光保存 6 个月
5	粉剂	2 支, 4°C 避光保存 6 个月
6	GSH 标准品粉剂	3.07mg X 2 支 4°C 保存 6 个月
7	GSH 标准品溶剂贮备液	5ml X 1 瓶, 4°C 保存 6 个月

试剂的配制和保存:

试剂编号	应用液的配制	保存条件
1	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。	4°C
2	甲粉: 加 90-100°C 的热蒸馏水 85ml, 充分完全溶解	
	乙液: 25ml X 1 瓶	

	试剂二应用液的配制: 将已配好的甲乙两种混合。此为过饱和溶液, 室温静置冷却后, 如有结晶, 则取上清进行实验。	4℃或室温保存 6 个月
3	加蒸馏水 100ml 溶解	4℃保存 6 个月
5	每支加蒸馏水 10ml 溶解	4℃避光保存五天
7	标准品溶剂应用液: GSH 标准品 溶剂贮备液: 双蒸水=1: 9 即 10 倍稀释配成应用液; 按所需量现用 现配。	4℃保存

GSH 应用液的配制:

1mmol/L GSH 溶液	GSH 的分子量为 307, 每次测定前将 1 支 3.07mg 的 GSH 标准品粉剂加到 GSH 标准品的溶剂应用液中, 定容至 10ml 即为 1mmol/L 的 GSH 溶液, 现用现配。
100u mol/L GSH 溶液	取 1mmol/L GSH 溶液 2ml 加 GSH 标准品溶剂应用液 18ml 定容至 20ml, 作标准曲线用, 若不做标准曲线可以不配。
20umol/L 的 GSH 标准溶液	取 1mmol/L GSH 溶液 0.2ml 加 GSH 标准品溶剂应用液定容至 10ml。即为 20umol/L 的 GSH 标准溶液。

全血中 GSH-PX 活力的测定

一, 样本前处理:

溶血液的配制: 1 取肝素抗凝全血 20ul, 以蒸馏水稀释至 1ml, 配成 1: 49 的溶血液; 鼠血 10ul 加蒸馏水至 1ml, 配成 1: 99 的溶血液。

2 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态, 方可进行检测。

3 已配好的溶血液中 GSH-PX 活力只能保持 45 分钟-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】请在正式实验前参见附录 I 摸索最佳取样浓度;

【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。在做正式实验前最好先取 1-2 只样本做预试。)

二, 全血中 GSH-PX 酶活力测定操作步骤:

(1)、酶促反应:

	非酶管 (对照管)	酶管 (测试管)
1mmol/L GSH (ml)	0.2	0.2
溶血液 (ml)		0.2

37℃水浴预温 5 分钟

试剂一 (37℃预温) (ml)	0.1	0.1
------------------	-----	-----

37℃水浴准确反应 5 分钟

试剂二 (ml)	2	2
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 (对照管)	酶管 (测定管)
GSH 标准品溶剂应用液 (ml)	1			
20umol/L 的 GSH 标准溶液 (ml)		1		
上清液 (ml)			1	1
试剂三 (ml)	1	1	1	1
试剂四 (ml)	0.25	0.25	0.25	0.25
试剂五 (ml)	0.05	0.05	0.05	0.05

混匀, 室温静置 15 分钟后, 412nm 处, 1cm 光径比色杯, 蒸馏水调零, 测各管 OD 值。

注意

注 1: 空白管、标准管一般只需做 1-2 只。

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。

最佳取样浓度的摸索

测试前先预试以确定最佳取样浓度: 当您第一次使用本试剂盒测试某一种新的样品时最好先做三只不同浓度的测试管。例如测全血时, 则分别取用蒸馏水 1: 24、1: 49、1: 99 稀释的溶血液有 200ul 进行预试,

然后进行计算: 抑制率 = $\frac{\text{对照管} - \text{测定管} OD}{\text{对照管} OD} \times 100\%$, 结果应该在 15%-55%之间, 然后取百

分抑制率在 45%或 50%左右的一管作为最佳取样浓度, 因为酶的百分抑制率与酶的活力呈抛物线关系, 若百分抑制率大于 60%时 (曲线的平坦部分), 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后测试。

这样做对科研结果分析及 t 检验有很大的帮助; 若百分抑制率大于 60%或小于 10%, 各个测定组的结果在 t 检验中无显著性差异。

三、全血中 GSH-PX 活力的计算:

1、全血 GSH-PX 活力的计算:

1、定义: 规定美 4ul 全血在 37℃反应 5 分钟, 扣除非酶促反应的作用, 使反应体系中 GSH 浓度降低 1umol/L 为一个酶活力单位。

2、计算公式:

公式一 (此公式计算较为精确, 方便):

$$\text{全血 GSH-PX 酶活力} = \frac{\text{非酶管} OD \text{值} - \text{酶管} OD \text{值}}{\text{标准管} OD \text{值} - \text{空白管} OD \text{值}} \times \text{标准液浓度 (20umol/L)} \times \text{稀释倍数} \left(5 \times \frac{1+X}{1+49} \right)$$

公式二 (标准曲线法):

$$\text{全血 GSH-PX 酶活力} = (\text{非酶管} OD \text{值} - \text{酶管} OD \text{值}) \times A^{**} \times \text{稀释倍数} \left(5 \times \frac{1+X}{1+49} \right)$$

【注】*从酶促反应表中看出反应液 0.5ml 加试剂二 2ml，在反应液中 5 倍稀释，所以乘以 5。

**A 为标准曲线斜率的倒数，本公司 A 值为 165.16。

***X 为全血稀释比例，例如 1：99 稀释，X 即为 99。

****1+49：溶血液为 1：49 稀释时，取 0.2ml 检测即等同于取样量为 4ul 的全血。

3、标准曲线的制定：

取 1mmol/L GSH 标准液 2ml 加试剂二 18ml 定容至 20ml，配制成 100umol/L 的 GSH 标准应用液。

管号	1	2	3	4	5	6
100ummol/LGSH	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2
试剂二 (ml)	2	1.6	1.2	0.8	0.8	0
试剂三 (ml)	2	2	2	2	2	2
试剂四 (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
试剂五 (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
混匀，室温静置 15 分钟，1cm 光径，412nm 处，蒸馏水调零，测各管吸光度。						
相当于 GSH 标准浓度 (umol/L)	0	20	40	60	80	100
本所参考吸光度	0.043	0.165	0.285	0.406	0.525	0.648

以浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，作标准曲线。

根据标准曲线计算 A 值： $A = \frac{\text{标准管中 GSH 浓度 (umol/L)}}{\text{标准管的 GSH 光密度值 (OD 值)}}$

【注】本实验室反复多次实验，并经统计学处理已得 A 值为 165.16，可作为参考。

4、计算举例：

a、取 1：49 溶血液 0.2ml 进行测定，测得非酶管 OD 值为 0.463，酶管 OD 值为 0.228，标准管 OD 值为 0.165，空白管 OD 值为 0.041。则计算结果为：

按公式一计算：

$$\begin{aligned} \text{全血 GSH-PX 酶活力} &= \frac{\text{非酶管 OD 值} - \text{酶管 OD 值}}{\text{标准管 OD 值} - \text{空白管 OD 值}} \times \text{标准液浓度 (20umol/L)} \times 5 \times \left(\frac{1+49}{1+49} \right) \\ &= \frac{0.463 - 0.228}{0.165 - 0.041} \times 20 \times 5 \times \frac{50}{50} = 189.52 \text{ 酶活力单位} \end{aligned}$$

按公式二计算：

$$\begin{aligned} \text{全血 GSH-PX 酶活力} &= (\text{非酶管 OD 值} - \text{酶管 OD 值}) \times A \times 5 \times \left(\frac{1+149}{1+49} \right) \\ &= (0.463 - 0.228) \times 165.16 \times 5 \times \frac{50}{50} = 194.06 \text{ 酶活力单位} \end{aligned}$$

b、取 1：149 大鼠溶血液 0.2ml 进行测定水浴时间 5 分钟，测得非酶管 OD 值 0.451，酶管 OD 值为 0.205，标准管 OD 值为 0.165，空白管 OD 值为 0.041。则计算结果为：

按公式一计算：

$$\text{全血 GSH-PX 酶活力} = \frac{\text{非酶管 OD 值} - \text{酶管 OD 值}}{\text{标准管 OD 值} - \text{空白管 OD 值}} \times \text{标准液浓度 (20umol/L)} \times 5 \times \left(\frac{1+149}{1+49} \right)$$

$$= \frac{0.451 - 0.205}{0.165 - 0.041} \times 20 \times 5 \times \frac{50}{50} = 595.16 \text{酶活力单位}$$

按公式二计算：

$$\text{全血GSH-PX酶活力} = (\text{非酶管OD值} - \text{酶管OD值}) \times A \times 5 \times \frac{1+149}{1+49}$$

$$= (0.451 - 0.205) \times 165.16 \times 5 \times \frac{150}{50} = 609.44 \text{酶活力单位}$$

2、对数法计算鼠全血中 GSH-PX 活力：

【注】采用对数法计算鼠全血中 GSH-PX 活力时，实验过程中 37℃ 水浴时间必须为 3 分钟

1、定义：规定 1ml 全血每分钟扣除非酶反应 1g (GSH) 的作用降低后，使 1g (GSH) 的降低值为一个酶活力单位。

2、公式：

$$\text{鼠全血 GSH-PX 活力单位} = \frac{\text{非酶管}I_g(GSH) - \text{酶管}I_g(GSH)}{3\text{分钟}} \times \frac{1}{\text{取样量}(0.2\text{ml})} \times \text{样本测试}$$

前稀释倍数

$$= \frac{I_g(\text{非酶管OD} - \text{空白管OD}) - I_g \times (\text{酶管OD} - \text{空白管OD})}{3\text{分钟}} \times \frac{\text{样本测试前稀释倍数}}{\text{取样量}(0.2\text{ml})}$$

3 计算举例：

取鼠血 1：149 的溶血液 0.2ml，水浴时间 3 分钟，测得非酶管 OD 值为 0.451，酶管 OD 值为 0.231，空白管 OD 值为 0.041。则计算结果为：

鼠全血 GSH-PX 活力单位

$$= \frac{\text{非酶管}I_g(GSH) - \text{酶管}I_g(GSH)}{3\text{分钟}} \times \frac{\text{样本测试前稀释倍数}(150)}{\text{取样量}(0.2\text{ml})}$$

$$= \frac{I_g(0.451 - 0.041) - I_g \times (0.231 - 0.041)}{3\text{分钟}} \times \frac{150}{0.2}$$

$$= 83.508 \text{酶活力单位}$$

组织、线粒体和细胞膜中 GSH-PX 活力的测定

一、样本的前处理：

1、10%组织匀浆的制备：

- a、取组织块（0.2-1g）用冰冷的生理盐水漂洗，除去血液，滤纸拭干，称重，放入 5-10ml 的小烧杯内。
- b、用量筒量取预冷的匀浆介质或生理盐水。匀浆介质或 0.86%生理盐水的量应该是组织重量的 9 倍。用移液管将总量 2/3 的匀浆介质或生理盐水移入烧杯。用眼科小剪尽快剪碎组织块（天热时小烧杯要放入冰水中）
- c、将剪碎的组织倒入玻璃匀浆管中，再将剩下的 1/3 匀浆介质或 0.86%生理盐水用来冲洗残余在小烧杯中的碎组织一起倒入玻璃匀浆管中进行匀浆，左手持匀浆管将下端插入盛有冰水的器皿中，右手将杆垂直插入套管中上下转动研磨数十次（6-8 分钟），充分磨碎，使组织匀浆化。或者用组织捣碎机 10000-15000r/min 研磨制成 10%组织匀浆，也可用内切式组织匀浆器制成 10%组织匀浆（匀浆时间 10 秒/次，间隙 30 秒，连续 3-4 次，温度 0-4℃），心肌组织等可延长匀浆时间。

【注】根据预试结果取最佳浓度进行测定。

- d、将制备好的 10%匀浆用普通离心机或低温离心机 3000r/min 左右离心 10-15 分钟。将离心好的匀浆留上清弃下面沉淀。

- e、根据你的实验需要，取适量上清液进行各种测定。

- 2、线粒体的制备：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。

二、组织、线粒体和细胞膜中 GSH-PX 活力测定操作表：

（1）、酶促反应：

	非酶管（对照管）	酶管（测试管）
1mmol/L GSH(ml)	0.2	0.2
样本** (ml)		0.2
37℃水浴预温 5 分钟		
试剂一（37℃预温）(ml)	0.1	0.1
37℃水浴准确反应 5 分钟		
试剂二 (ml)	2	2
样本 (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（对照管）	酶管（测定管）
GSH 标准品溶剂应用液 (ml)	1			
20umol/L GSH 标准液 (ml)		1		
上清液 (ml)			1	1
试剂三 (ml)	1	1	1	1
试剂四 (ml)	0.25	0.25	0.25	0.25
试剂五 (ml)	0.05	0.05	0.05	0.05

混匀，室温静置 15 分钟后，412nm 处，1cm 光径比色杯，蒸馏水调零，测各管 OD 值。

注意

注 1：空白管、标准管一般只需做 1-2 只。

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。

最佳取样量浓度的选择

测试前先预试以确定最佳取样浓度：当您第一次使用本试剂盒测试某一种新的样品时最好先做三只不同浓度的测试管。例如想测组织匀浆时，则分别取 10%、5%、1%的匀浆 200ul 进行预试，然后进行计算：抑

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照管 OD} - \text{测定管 OD}}{\text{对照管 OD}} \times 100\%$$

结果应该在 15%-55%之间，然后取百分抑制率在 45%或 50%左右的一管作为最佳取样浓度，因为酶的百分抑制率与酶的活力呈抛物线关系，若百分抑制率大于 60%时（曲线的平坦部分），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后测试。

这样做对科研结果分析及 t 检验有很大的帮助；若百分抑制率大于 60%或小于 10%，各个测定组的结果在 t 检验中无显著性差异。

二、组织中 GSH-PX 活力计算：

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

【注】组织蛋白的测定：参照实验方法学中的双缩脲法、考马斯亮兰法、紫外线及磺基水杨酸法测出所取样本中的蛋白毫克数。

(2)、公式：

1、公式一：

$$\text{组织 GSH-PX 酶活力} = \frac{\text{非酶管 OD 值} - \text{酶管 OD 值}}{\text{标准管 OD 值} - \text{空白管 OD 值}} \times \text{标准管浓度 (20umol/L)} \times \text{稀释倍数 (5*)} \div \text{反}$$

应时间 \div (取样量 \times 样本蛋白含量)

2、公式二：

组织 GSH-PX 酶活力 = (非酶管 OD 值 - 酶管 OD 值) \times A \times 稀释倍数 (5*) \div 反应时间 \div (取样量 \times 样本蛋白含量)

【注】1、从酶促反应中看出反应液 0.5ml 加试剂二 2ml，在反应液中为 5 倍稀释，所以乘 5。

2、公式二中 A 为标准曲线斜率的倒数，本所 A 值为 165.16

(3)、计算举例：

取 0.25% 鼠肝组织匀浆 0.2ml 进行测定，测得非酶管 OD 值为 0.480，酶管 OD 值为 0.172，标准管 OD 值为 0.163，空白管 OD 值为 0.041，1% 匀浆蛋白我 0.910mg/ml，标准管浓度为 20umol/L。则计算公式为：

$$\text{组织 GSH-PX 酶活力} = \frac{\text{非酶管 OD 值} - \text{酶管 OD 值}}{\text{标准管 OD 值} - \text{空白管 OD 值}} \times \text{标准管浓度 (20umol/L)} \times \text{稀释倍数 (5*)} \div \text{反}$$

应时间 \div (取样量 \times 蛋白含量)

$$= \frac{0.480 - 0.172}{0.163 - 0.041} \times 20 \times 5 \div 5 \div (0.910 \div 4 \times 0.2)$$

【注】*测试 GSH-PX 时用的 0.25% 的鼠肝匀浆而测蛋白时用 1% 的匀浆，所以要除以 4。

2、按公式二计算：

$$\begin{aligned} \text{肝组织 GPX 活力} &= (\text{非酶管 OD} - \text{酶管 OD}) \times A \times \text{稀释倍数} / \text{反应时间} / (\text{蛋白含量} \times \text{取样量}) \\ &= (0.480 - 0.172) \times 165.168 \times 5 / 5 / (0.910 / 4 \times 0.2) \end{aligned}$$

=1118.01 活力单位

血清（浆）中 GSH-PX 活力的测定

一、血清（浆）GPX 测定操作方法：

（1）、酶促反应：

加入物	非酶管（对照管）	酶管（测试管）
1mmol/L GSH (ml)	0.2	0.2
最佳取样浓度血清（浆）(ml)		0.1
37℃水浴预温 5 分钟		
试剂一（37℃预温）(ml)	0.1	0.1
37℃水浴准确反应 5 分钟		
试剂二（ml）	2	2
最佳取样浓度血清（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：

加入物	空白管	标准管	非酶管（对照管）	酶管（测定管）
GSH 标准品溶剂应用液 (ml)	1			
20umol/L GSH 标准液 (ml)		1		
上清液 (ml)			1	1
试剂三 (ml)	1	1	1	1
试剂四 (ml)	0.25	0.25	0.25	0.25
试剂五 (ml)	0.05	0.05	0.05	0.05

混匀，15 分钟后，412nm 处，1cm 光径比色杯，蒸馏水调零，测各管 OD 值。

注意

注 1：空白管、标准管一般只需做 1-2 只。

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。

最佳取样量浓度的摸索

测试前先预试以确定最佳取样浓度：当您第一次使用本试剂盒测试某一种新的样品时最好先做三只不同浓度的测试管。例如想测血清，则分别取未稀释的血清及生理盐水 1：1、1：4、1：9、1：19 稀释的血清进

行预试，然后进行计算：抑制率 = $\frac{\text{对照管 OD 值} - \text{测定管 OD}}{\text{对照管 OD}} \times 100\%$ 。结果应该

在 15%-55% 之间，然后取百分抑制率在 45% 或 50% 左右的一管作为最佳取样浓度，因为酶的百分抑制率与酶的活力呈抛物线关系，若百分抑制率大于 60% 时（曲线的平坦部分），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后测试。

这样做对科研结果分析及 t 检验有很大的帮助；若百分抑制率大于 60% 或小于 10%，各个测定组的结果在 t 检验中无显著性差异。

二、血清中 GSH-PX 酶活力的计算:

(1)、定义:规定每0.1ml血清在37℃反应5分钟,扣除非酶促反应作用,使反应体系中GSH浓度降低1umol/L为一个酶活力单位。

(2)、公式:

$$\text{血清(浆) GSH-PX 活力} = \frac{\text{非酶管OD值} - \text{酶管OD值}}{\text{标准管OD值} - \text{空白管OD值}} \times \text{标准管浓度}(20\text{umol/L}) \times \text{稀释倍数}(6^*)$$

*样本测试前稀释倍数

【注】*从酶促反应表中看出反应液0.4ml,加试剂二2ml,在反应液中6倍稀释。

(3)、计算举例:

取经生理盐水1:4稀释的大鼠血清0.1ml进行GSH-PX活力测定,测得空白管OD值为0.041,标准管OD值为0.165,非酶管OD值为0.475,酶管OD值为0.293。则计算结果为:

$$\text{大鼠血清 GSH-PX 活力} = \frac{0.475 - 0.293}{0.165 - 0.041} \times 20 \times 6 \times 5 = 880.65 \text{ 酶活力}$$

注意点

- (1) 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。测试前先将其它准备工作做好再制备溶血液。
- (2) 血样要新鲜,肝素抗凝后放冰箱4-8℃存放不要超过48小时。
- (3) 测溶血液中GPX含量要注意样品测试前红细胞一定要充分溶血
- (4) 试剂一存放瓶要彻底洗干净,应用液要现用现配。
- (5) 1mmol/L GSH、0.1mmol/L GSH、20umol/L GSH的标准品,现用现配。
- (6) 37℃水浴反应时间5分钟或3分钟,记录反应时间要准确。
- (7) 测定上清液当天提取,当天测试
- (8) 组织蛋白质的测定法有多种,可参考实验方法学部分,或够买本研究所蛋白定量试剂盒(考马测试盒)
- (9) 本试剂盒仅用于科研。

细胞、培养上清中 GSH-PX 活力的测定

一、样本的前处理:

1.培养细胞的前处理:将培养细胞消化,1000-1500转/分钟离心10分钟,弃上清,留下层细胞,每管加0.3-0.5ml生理盐水或匀浆介质制备成106/cm3细胞悬液,即106/ml,再进行破碎。破碎细胞的方法有三种:1.用匀浆器匀浆。2.用超声粉碎器粉碎。3.反复冻溶3次(第3种方法有时会影响活力)。制备好的细胞悬液一般不需要离心,同时进行蛋白浓度测定。再将细胞匀浆液稀释成不同浓度进行预试,根据预试结果决定取样浓度。

2.培养上清:细胞悬浮培养,需100-1500转/分钟离心10分钟,收集培养上清进行测定;或者细胞贴壁培养,可直接吸取上清进行测定。

二、细胞、培养上清中 GSH-PX 活力测定操作表:

(1)、酶促反应:

加入物	非酶管(对照管)	酶管(测试管)
1mmol/L GSH (ml)	0.2	0.2
待测样本 (ml)		0.2
37℃水浴预温5分钟		

试剂一（37℃预温）（ml）	0.1	0.1
37℃水浴准确反应 5 分钟		
试剂二（ml）	2	2
待测样本（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：

加入物	空白管	标准管	非酶管（对照管）	酶管（测定管）
GSH 标准品溶剂应用液（ml）	1			
20umol/L GSH 标准液（ml）		1		
上清液（ml）			1	1
试剂三（ml）	1	1	1	1
试剂四（ml）	0.25	0.25	0.25	0.25
试剂五（ml）	0.05	0.05	0.05	0.05

混匀，15 分钟后，412nm 处，1cm 光径比色杯，蒸馏水调零，测各管 OD 值。

三、细胞样本中 GSH-PX 酶活力的计算：

(1)、定义：规定每毫克蛋白质，每分钟扣除非酶促反应作用，使反应体系中 GSH 浓度降低 1umol/L 为一个酶活力单位。

(2)、公式：

$$\text{细胞中 GSH-PX 酶活力} = \frac{\text{非酶管 OD 值} - \text{酶管 OD 值}}{\text{标准管 OD 值} - \text{空白管 OD 值}} \times \text{标准管浓度 (20umol/L)} \times \text{稀释倍数 (5*)} \div$$

反应时间 ÷ (取样量 × 样本蛋白含量)

【注】*从酶促反应表中看出反应液 0.5ml，加试剂二 2ml，在反应液中 5 倍稀释。

(2) 培养上清中 GSH-PX 酶活力的计算：

定义：规定每 0.1ml 培养上清在 37℃ 反应 5 分钟，扣除非酶促反应作用，使反应体系中 GSH 浓度降低 1umol/L 为一个酶活力单位。

计算公式：

$$\text{培养上清中 GSH-PX 活力单位} = \frac{\text{非酶管 OD 值} - \text{酶管 OD 值}}{\text{标准管 OD 值} - \text{空白管 OD 值}} \times \text{标准管浓度 (20umol/L)} \times \text{稀释倍数}$$

(5*) ÷ 样本测试前稀释倍数

【注】*从酶促反应表中看出反应液 0.5ml，加试剂二 2ml，在反应液中 5 倍稀释。

四 最佳取样浓度或最佳取样量的摸索：

1.细胞样本：细胞匀浆液可根据活力情况用匀浆介质 1:1、1:3、1:7 等倍数稀释，按照操作表进行测定以确定最佳取样量或取样浓度（控制（抑制率=（对照管 OD-测定管 OD）/对照管 OD × 100%）在 45%-55%之间为宜），具体以实验结果为准。

2.培养上清：

培养上清中活力比较偏低，一般直接取样进行测定，具体以实验结果为准。

五.计算举例：

例 1:取制备好细胞匀浆液 0.2ml 进行测定，测得非酶管 OD 值为 0.499，酶管 OD 值为 0.439，标准管 OD

值为 0.163，空白管 OD 值为 0.041，同时测得该匀浆蛋白为 0.3835mgprot/ml，标准管浓度为 20umol/L。则计算结果为：

$$\text{细胞中 GSH-PX 酶活力} = \frac{\text{非酶管 OD 值} - \text{酶管 OD 值}}{\text{标准管 OD 值} - \text{空白管 OD 值}} \times \text{标准管浓度 (20umol/L)} \times \text{稀释倍数 (5*)} \div$$

反应时间 ÷ (取样量 × 样本蛋白含量)

$$= [(0.499-0.439) / (0.163-0.041)] \times 20 \times 5 \div 5 \div (0.3835 \times 0.2) = 128.2408 \text{ 活力单位 / mgprot}$$

例 2:取培养上清 0.2ml 进行测定，测得非酶管 OD 值为 0.496，酶管 OD 值为 0.471，标准管 OD 值为 0.163，空白管 OD 值为 0.041，标准管浓度为 20umol/L。则计算结果为：

$$\text{培养上清中 GSH-PX 活力单位} = \frac{\text{非酶管 OD 值} - \text{酶管 OD 值}}{\text{标准管 OD 值} - \text{空白管 OD 值}} \times \text{标准管浓度 (20umol/L)} \times \text{稀释倍数}$$

$$= [(0.496-0.471) / (0.163-0.041)] \times 20 \times 5 = 20.4918 \text{ 活力单位}$$

附录 I

全血中 GSH-PX 最佳取样浓度及最佳取样量摸索方法

一、样本前处理：

全血：分别用蒸馏水按 1：24、1：49、1：99、1：149、1：199 等比例稀释成一系列不同浓度的溶血液，分别取一系列不同浓度溶血液 0.2ml 按全血的测定操作表进行检测。

二、操作步骤：

溶血液的最佳取样浓度及最佳取样量的测定举例：

- 1、样本来源：南医送来正常组大鼠尾部全血测 GSH-PX 为例。
- 2、样本稀释：分别用蒸馏水将大鼠全血按 1：24、1：49、1：59、1：69、1：79、1：89、1：99、1：149、1：199 的比例稀释成一系列不同浓度的溶血液，分别取一系列不同浓度溶血液 0.2ml 按全血的测定操作表进行检测。
- 3、酶促反应：

	非酶管* (对照管)	酶管 (测试管)
1mmol/L GSH (ml)	0.2	0.2
不同浓度溶血液 (ml)		0.1
37℃水浴预温 5 分钟		
试剂一 (37℃预温) (ml)	0.1	0.1
37℃水浴准确反应 5 分钟		
试剂二 (ml)	2	2
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。

4、显色反应：

	空白管	标准管	非酶管 (对照管)	酶管 (测定管)
GSH 标准品溶剂应用液 (ml)	1			
20umol/L GSH 标准液 (ml)		1		

上清液 (ml)			1	1
试剂三 (ml)	1	1	1	1
试剂四 (ml)	0.25	0.25	0.25	0.25
试剂五 (ml)	0.05	0.05	0.05	0.05

混匀，15 分钟后，412nm 处，1cm 光径比色杯，蒸馏水调零，测各管 OD 值。

5、溶血液计算公式：

$$\text{溶血液 GPX 酶活力} = \frac{\text{非酶管 OD 值} - \text{酶管 OD 值}}{\text{标准管 OD 值} - \text{空白管 OD 值}} \times \text{标准液浓度 (20unol/L)} \times \text{稀释倍数} \left(5 \times \frac{1+X}{1+49} \right)$$

【注】：X 为全血稀释比例，例如 1：99 稀释，X 即为 99。

6、预试结果：

样本浓度	OD 值	平均 OD 值	抑制率
空白	0.041/0.040	0.041	
标准	0.162/0.164	0.163	
对照	0.449/0.452	0.451	
1: 24	0.078/0.079	0.079	82.48%
1: 49	0.093/0.098	0.096	78.71%
1: 59	0.106/0.107	0.107	76.27%
1: 69	0.117/0.118	0.118	73.84%
1: 79	0.128/0.131	0.130	71.18%
1: 89	0.141/0.147	0.144	68.07%
1: 99	0.160/0.165	0.163	63.86%
*1: 149	0.229/0.232	0.231	48.78%
1: 199	0.298/0.297	0.298	33.92%

7、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。

附录II

组织匀浆中 GSH-PX 最佳取样浓度及最佳取样量摸索方法

- 一、样本来源：以正常组小鼠肝组织匀浆测 GSH-PX 为例。
- 二、样本稀释：取 1%的肝匀浆 50ul 用考马斯亮兰定蛋白，测得蛋白含量为 0.910mg/ml。分别用生理盐水将 1%的肝匀浆稀释成 1.0%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.25%、0.2%、0.1%、0.55%一系列不同浓度的组织匀浆，分别取一系列不同浓度组织匀浆 0.2ml 按组织的测定操作表进行检测。
- 三、操作步骤
 - 1、酶促反应：

	非酶管*（对照管）	酶管（测试管）
1mmol/L GSH (ml)	0.2	0.2

不同浓度匀浆1)		0.2
37℃水浴预温 5 分钟		
试剂一（37℃预温）(ml)	0.1	0.1
37℃水浴准确反应 5 分钟		
试剂二 (ml)	2	2
相应浓度匀浆	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（对照管）	酶管（测定管）
GSH 标准品溶剂应用液 (ml)	1			
20umol/L GSH 标准液 (ml)		1		
上清液 (ml)			1	1
试剂三 (ml)	1	1	1	1
试剂四 (ml)	0.25	0.25	0.25	0.25
试剂五 (ml)	0.05	0.05	0.05	0.05

混匀，15 分钟后，412nm 处，1cm 光径比色杯，蒸馏水调零，测各管 OD 值。

3、组织匀浆、线粒体、细胞等计算公式：

$$\text{组织，线粒体，细胞等 GSH-PX 活力 (U/mgprot)} = \frac{\text{非酶管 OD 值} - \text{酶管 OD 值}}{\text{标准管 OD 值} - \text{空白管 OD 值}} \times \text{标准管浓度}$$

$$(\text{20umol/L}) \times \text{稀释倍数 (5)} \div (\text{蛋白含量} \times \text{取样量}) \div \text{反应时间}$$

4、预试结果

样本浓度	OD 值	平均 OD 值	抑制率	蛋白含量 (gprot/L)	结果(U/mgprot)
空白	0.041/0.040	0.041			
标准	0.162/0.164	0.163			
对照	0.462/0.463	0.463			
0.05%	0.409/0.412	0.411	11.23%	0.0455	187.3536
0.1%	0.355/0.357	0.356	23.11%	0.091	192.7581
0.2%	0.282/0.283	0.283	38.88%	0.182	162.1329
0.25%	0.243/0.245	0.244	47.30%	0.2275	157.8094
0.3%	0.212/0.213	0.213	55.00%	0.273	150.1231
0.4%	0.173/0.176	0.175	62.2%	0.364	129.7064
0.5%	0.144/0.145	0.145	68.68%	0.455	114.574
0.6%	0.125/0.121	0.123	73.43%	0.546	102.0837
0.7%	0.107/0.111	0.109	76.46%	0.637	91.10328
0.8%	0.093/0.095	0.094	79.7%	0.728	83.09314
0.9%	0.089/0.089	0.089	80.78%	0.819	74.86139
1.0%	0.084/0.085	0.085	81.64%	0.910	68.09584

5、结论:

*从上面的数据统计可以看出,抑制率(抑制率 = $\frac{\text{对照管OD值} - \text{测定管OD值}}{\text{对照管OD}} \times 100\%$)

在 45%-55%之间的最佳取样浓度为 0.25%-0.3%即取 0.25%正常组小鼠肝组织匀浆 0.2ml 进行 GSH-PX 正式检测。

附录III

血清(浆)中 GSH-PX 最佳取样浓度及最佳取样量摸索方法

- 一、样本来源:以南医送来正常组大鼠眼眶取全血,肝素抗凝取血浆测 GSH-PX 为例。
- 二、样本稀释: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。

三、操作步骤:

1、酶促反应:

	非酶管*(对照管)	酶管(测试管)
1mmol/L GSH (ml)	0.2	0.2
不同浓度血浆 (ml)		0.1
37°C水浴预温 5 分钟		
试剂一(37°C预温)(ml)	0.1	0.1
37°C水浴准确反应 5 分钟		
试剂二(ml)	2	2
相应浓血浆(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(对照管)	酶管(测定管)
GSH 标准品溶剂应用液 (ml)	1			
20umol/L GSH (ml)		1		
上清液 (ml)			1	1
试剂三 (ml)	1	1	1	1
试剂四 (ml)	0.25	0.25	0.25	0.25
试剂五 (ml)	0.05	0.05	0.05	0.05

混匀, 15 分钟后, 412nm 处, 1cm 光径比色杯, 蒸馏水调零, 测各管 OD 值。

3、血清(浆)计算公式:

血清(浆) GSH-PX 活力 = $\frac{\text{非酶管OD值} - \text{酶管OD值}}{\text{标准管OD值} - \text{空白管OD值}} \times \text{标准管浓度}(20\mu\text{mol/L}) \times \text{稀释倍数}(6) \times$

样本测试前稀释倍数

4、预试结果

样本浓度	OD 值	平均 OD 值	抑制率
空白	0.041/0.040	0.041	
标准	0.162/0.164	0.163	

对照	0.518/0.520	0.519	
1: 1	0.114/0.120	0.117	77.46%
*1: 4	0.282/0.284	0.283	45.67%
1: 7	0.361/0.369	0.365	29.67%
1: 9	0.395/0.399	0.397	23.51%
1: 14	0.420/0.421	0.421	18.88%
1: 19	0.446/0.437	0.442	14.84%

5、结论:

*从上面的数据统计可以看出，抑制率 $\left(\text{抑制率} = \frac{\text{对照管OD值} - \text{测定管OD值}}{\text{对照管OD}} \times 100\% \right)$

在 45%-55%之间的最佳取样浓度为 0.25%-0.3%即取 0.25%正常组小鼠肝组织匀浆 0.2ml 进行 GSH-PX 正式检测

注意
在您进行正式检测前，需要从每组中取 2-3 个样本进行上面的预试实验，确定最佳浓度和最佳取样量。在保证抑制率 $\left(\text{抑制率} = \frac{\text{对照管OD值} - \text{测定管OD值}}{\text{对照管OD}} \times 100\% \right)$ 在 20%-50% 之间的同时，每组之间也应该有所差距，如果您有疑问，则需要重新摸索最佳浓度和最佳取样量。

附录 V GSH 标准曲线的制备

标准曲线的制定:

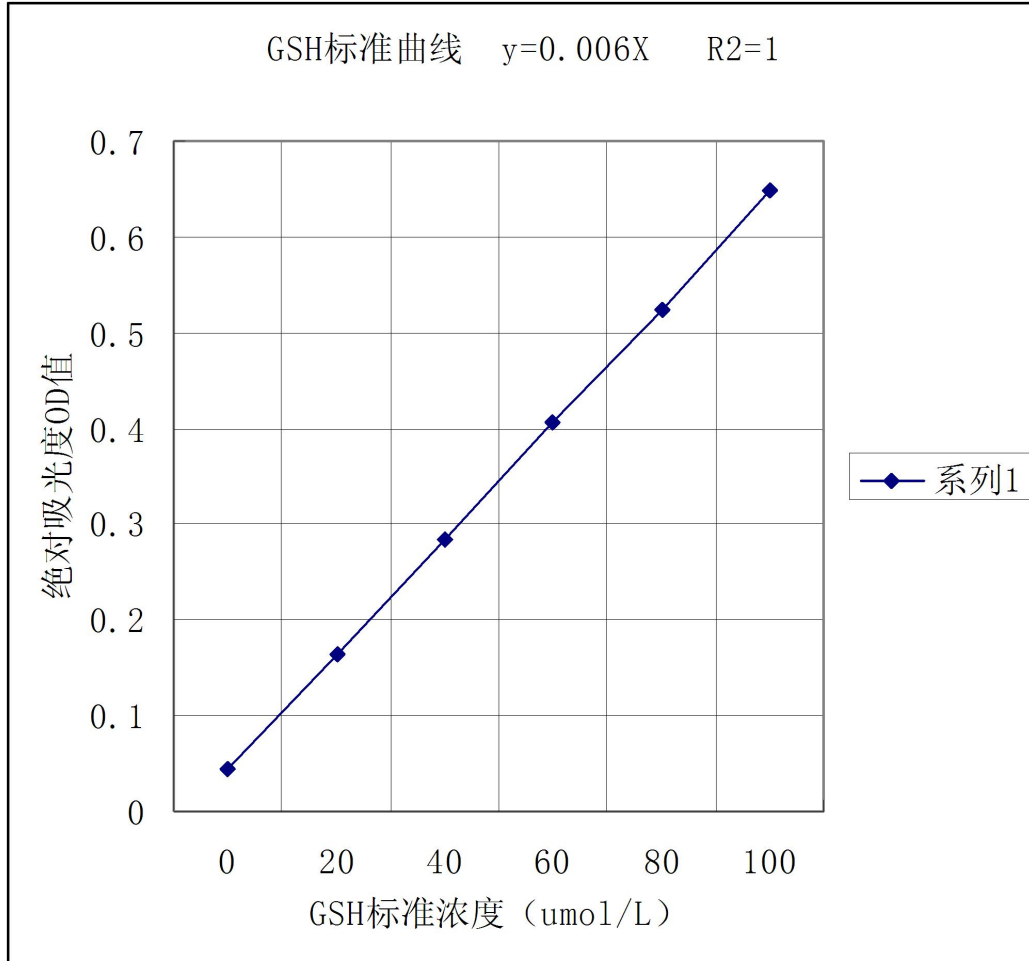
取 1mmol/L GSH 标准液 2ml 加 GSH 标准品溶剂应用液 18ml 定容至 20ml, 配制成 100umol/L 的 GSH 标准应用液。

管号	1	2	3	4	5	6
100umol/L GSH (ml)	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2
试剂二 (ml)	2	1.6	1.2	0.8	0.4	0
试剂三 (ml)	2	2	2	2	2	2
试剂四 (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
试剂五 (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
混匀，室温静置 15 分钟，1cm 光径，412nm 处，蒸馏水调零，测各管吸光度。						
相当于 GSH 标准浓度 (umol/L)	0	20	40	60	80	100
本所参考吸光度	0.043	0.165	0.285	0.406	0.525	0.648

以浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，作标准曲线，

根据标准曲线计算 A 值： $A = \frac{\text{标准管中GSH浓度值 (umol/L)}}{\text{标准管的GSH光密度值 (OD值)}}$

【注】本实验室反复多次实验，并经统计学处理已得 A 值为 165.16，可作为参考。



凯基相关产品（详见凯基网站 <http://www.keygentec.com.cn>）

细胞株、细胞提取物及细胞培养产品

- 人类肿瘤细胞株 动物肿瘤细胞株 正常细胞株 肿瘤耐药细胞株
- 细胞提取物（RNA/DNA/蛋白）
- 细胞培养相关产品

细胞凋亡

一、细胞凋亡研究试剂盒

- Annexin V-FITC/ EGFP/PE 细胞凋亡检测试剂盒
- TUNEL 凋亡原位检测系列试剂盒
- Caspase(2、3、6、8、9)系列细胞凋亡检测试剂盒
- 线粒体膜电位检测试剂盒（JC-1）
- TRAP-PCR 端粒酶活性检测试剂盒
- DNA Ladder 检测试剂盒

二、细胞凋亡相关抗体

三、凋亡诱导剂、抑制剂

四、氧化应激损伤检测试剂盒

五、细胞凋亡研究辅助试剂

细胞增殖/毒性/活力与细胞周期

- 凯基细胞周期检测试剂盒
- MTT、XTT、WST-1、CCK-8 等系列细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒

细胞染色产品

- 活细胞/凋亡细胞/坏死细胞鉴别试剂盒（AO/EB 法.荧光显微镜）
- 凯基细胞凋亡形态学检测试剂盒
- 罗丹明 123、DAPI、PI、7-AAD 、Hoechst 33258、EB、吖啶橙染色试剂盒

亚细胞组分制备

- 细胞核、线粒体制备试剂盒
- 细胞悬液制备试剂盒（组织消化试剂盒）