

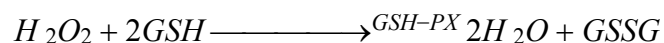
谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)测试盒

比色法：50 管/48 样

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完整的作用。GSH-PX 的活性中心是硒半胱氨酸，硒是 GSH-PX 的必需部分，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。

测定原理

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。



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。

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。

试剂盒有效期和保存条件

本试剂盒保存期：6 个月；贮存温度：4℃。

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：则分别取用蒸馏水 1：24、1：49、1：99 稀释的溶血液 200l 进行预试

测组织匀浆：则分别取 10%、5%、1%等的匀浆 200l 进行预试（不同样本稀释浓度不同）

测血清：则分别取未稀释的血清及用生理盐水 1：1、1：4、1：9、1：19 稀释的血清 100 进行预试，

然后进行计算：抑制率 = $\frac{\text{非酶管OD值} - \text{酶管OD值}}{\text{非酶管OD值}} \times 100\%$ ，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。（需要注意的是组织匀浆或其他类似样本有时本身浊度或颜色有干扰时，预实验不必通过抑制率计算，这时可以用对照 OD 值-测定 OD 值在 0.2 左右时来判定）

这样做对科研结果分析及检验有很大帮助；若百分抑制率大于 60%或小于 10%，各个测定组的结果在检验中有可能无显著性差异。

试剂盒的组成和配制

试剂编号	名称	数量及保存条件
试剂一	贮备液	1ml×1 瓶；4℃保存 6 个月
1 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，需多少配多少；4℃保存。		
试剂二	甲粉	1 瓶；4℃保存 6 个月
	甲粉：加 90~100℃的热蒸馏水 85ml，充分完全溶解	
	乙液	25ml×1 瓶；4℃保存 6 个月
试剂二应用液的配制：将已配好的甲液与乙液充分混合。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。		
试剂三	粉剂	1 瓶；4℃保存 6 个月
3 试剂三应用液的配制：加蒸馏水 100ml 溶解；溶解时也可以放在 37℃环境中加速溶解。		
试剂四	液体	25 ml×1 瓶；4℃避光保存 6 个月
试剂五	粉剂	2 支；4℃避光保存 6 个月
试剂五应用液的配制：每支加蒸馏水 10ml 溶解；4℃避光保存五天		
试剂六	GSH 标准品粉剂	3.07mg×2 支；4℃保存 6 个月
试剂七	GSH 标准品溶剂贮备液	5ml×1 瓶；4℃保存 6 个月

7 标准品溶剂应用液：贮备液：蒸馏水=1：9 即 10 倍稀释配成应用液，现用现配；4℃保存

1mmol/LGSH 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。

8 100 μ mol/LGSH 溶液：取 1mmol/LGSH 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。（见附录 V：GSH 标准曲线的制备）

20 mol/L 的 GSH 标准溶液：取 1mmol/LGSH 溶液 0.2 ml 加 GSH 标准品溶剂应用液定容至 10ml，即为 20 mol/L 的 GSH 标准溶液。

全血中 GSH-PX 活力的测定

一、样本的前处理：溶血液的配制

- ①、取肝素抗凝全血 20 μ l，以蒸馏水稀释至 1ml，配成 1 : 49 的溶血液；鼠血 10 μ l 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，方可进行检测。
- ③、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 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C）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，详见溶血液的最佳取样浓度及最佳取样量的摸索举例；

【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 $^{\circ}$ C 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。）

二、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 37 $^{\circ}$ C 预温)

	非酶管	酶管
1mmol/L GSH (ml)	0.2	0.2
待测溶血液 (ml)		0.2
37 $^{\circ}$ C 水浴预温 5 分钟		
试剂一应用液	0.1	0.1
37 $^{\circ}$ C 水浴准确反应 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			
20 mol/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，1cm 光径比色杯，蒸馏水调零，测各管 OD 值。				

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 (0.2~1 克) 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 (PH7.4, 0.01mol/L 蔗糖, 0.01mol/L Tris-HCl, 0.0001mol/LEDTA2Na 溶液) 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。
- 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。取上清待测。【注】根据预试结果取最佳浓度进行测定

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。

三、组织、线粒体和细胞膜中 GSH-PX 活力测定操作表:

(1)、酶促反应:

(试剂一应用液提前在 37°C 预温)

	非酶管	酶管
1mmol/L GSH (ml)	0.2	0.2
待测匀浆 (ml)		0.2
37°C 水浴预温 5 分钟		
试剂一应用液 (ml)	0.1	0.1
37°C 水浴准确反应 5 分钟		
试剂二应用液 (ml)	2	2
待测匀浆 (ml)	2	

(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			
20 mol/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, 1cm 光径比色杯, 蒸馏水调零, 测各管 OD 值。				

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 (0.2~1 克) 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 (PH7.4, 0.01mol/L 蔗糖, 0.01mol/L Tris-HCl, 0.0001mol/L EDTA2Na 溶液) 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, 间隔 30 秒, 连续 3~4 次, 温度 0~4℃), 心肌组织等可延长匀浆时间。

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。取上清待测。【注】根据预试结果取最佳浓度进行测定

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: (试剂一应用液提前在 37℃ 预温)

	非酶管	酶管
1mmol/L GSH (ml)	0.2	0.2
待测匀浆 (ml)		0.2
37° C 水浴预温 5 分钟		
试剂一应用液 (ml)	0.1	0.1
37° C 水浴准确反应 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 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			
20 mol/L GSH 标准液 (ml)		1		
上清液 (ml)			1	1
试剂三应用液 (ml)	1	1	1	
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, 1cm 光径比色杯, 蒸馏水调零, 测各管 OD 值。

血清(浆)中 GSH-PX 活力的测定

一、血清(浆) GSH-PX 测定操作方法:

(1)、酶促反应: (试剂一应用液提前在 37° C 预温)

	非酶管	酶管
1mmol/L GSH (ml)	0.2	0.2
待测血清(浆) (ml)		0.1
37° C 水浴预温 5 分钟		
试剂一应用液 (ml)	0.1	0.1
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。

(3)、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 mol/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。

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。
- 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。（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）
- 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、0.1 mmol/L GSH、20 μ mol/L GSH 的标准品，现用现配。
- 6、37℃ 水浴反应时间 5 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，或购买本研究所蛋白定量试剂盒。