谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)试剂盒
微板法

使用说明书

产品货号：BP10456W

注意：请在试剂盒保质期内使用，具体保质期见外包装标签。

本产品仅供科学研究使用，不能用于临床诊断。

检测范围：30-2500U

灵敏度：30U

有效期：6 个月

保存温度：2-8℃和-20℃

检测原理：

谷胱甘肽过氧化物酶（GPx，EC1.11.1.9）代表一种具有过氧化物酶活性的酶家族，在保护生物免受氧化损伤中起重要作用。以往以过氧化氢为底物进行检测，过氧化氢酶的干扰，本试剂盒提供的有机过氧化物试剂（Cum-OOH)不会被过氧化氢酶分解，因而可以特异地检测出谷胱甘肽过氧化物酶的活力。因此本试剂盒可以定量检测总谷胱甘肽过氧化物酶。GSH 和 DTNB 反应产生黄色物质，后者在 412nm 下有最大吸收峰。

注意事项：

1. 不能使用过期产品，不同货号和批号组分不得混用。

2. 样本中不能添加 DTT、2-巯基乙醇等还原性物质，不能添加 Triton X-100、Tween 等去污剂。

3. 本试剂开封后请尽快使用，以免空气、采样污染引起试剂变质。

4. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。

5. 如果可能传播疾病，所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。

6. 试剂严格按保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。试剂盒中如有提供粉剂，使用前请甩几下，使粉剂落入底部。

试剂盒组分：

试剂名称	规格（48T/20S）	规格（96T/44S）	保存条件
试剂一	55ml×1 瓶	110ml×1 瓶	2-8℃
试剂二	0.5mL×1 瓶	1mL×1 瓶	2-8℃
试剂三	10mL×1 瓶	20mL×1 瓶	2-8℃，避光
试剂四	5mL×1 瓶	10mL×1 瓶	2-8℃
试剂五	1mL×1 瓶	2mL×1 瓶	2-8℃，避光
标准品	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃，避光

所需仪器耗材及试剂：

离心机、酶标仪、可调式移液器、蒸馏水、恒温箱或水浴锅。

样本处理及要求：

1. **试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围**，建议实验前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：30-2500U，如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩，样本的稀释液为试剂一。

2. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议做预实验验证其检测有效性。

3. **组织样本**：按照组织质量（g）：试剂一体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一进行匀浆）；匀浆后，4℃，10000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。留取部分上清待测。

4. **细菌、细胞样本**：收集细菌或细胞，离心后去上清。按照细胞或细菌数量（10^4）：试剂一体积(mL)为 500~1000：1 的比例(建议按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一），4℃冰浴匀浆；10000 g 4℃离心 30min，取上清液待测。

5. **血清（浆）等液体样本**：直接测定。若浑浊，离心后取上清测定。

检测前准备工作：

1. 请提前取出试剂盒，平衡至室温。

2. **标准品溶液的配制：**用前使粉体落入底部，再加 1mL 蒸馏水溶解为标准品母液（10mmol/L），-20℃可保存两天。取 10mmol/L 标准品母液 0.2mL 加入 1.8mL 蒸馏水混合均匀为 1mmol/L 标准品溶液（可多稀释一管，1mmol/L 标准品同时作为酶促反应底物）。将标准品溶液用蒸馏水稀释为以下浓度梯度的标准品：0、50、100、150、200、250、300、400μmol/L。（注：配制目标浓度的标准品工作液时，每次请根据表格从对应浓度的标准品溶液中取对应的体积与相应稀释液混合均匀后使用。）

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(μmol/L)	0	50	100	150	200	250	300	400
1mmol/L 标准品(μL)	0	50	100	150	200	250	300	400
蒸馏水(μL)	1000	950	900	850	800	750	700	600

也可根据实际样本来调整标准品浓度。按照标准管加样体系操作，依据结果即可制作标准曲线；本说明书中的标曲是用蒸馏水稀释得出，若选取其他稀释液可选择重做标曲。

操作步骤：

1. **酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 412nm。**

2. **酶促反应（在 EP 中依次加入）：**

试剂名称(μL)	测定管	对照管
1mmol/L 标准品	20	20
样本	20	
混匀，37℃预温 5min，试剂二同时 37℃预温。		
试剂二	10	10
37℃准确反应 5min。		
试剂三	200	200
样本		20
12000 g 离心 10min，取上清液待测。		

3. **显色反应（在 96 孔板中依次加入）：**

试剂名称(μL)	标准孔	测定孔	对照孔
不同浓度标准品	80		
样本上清液		80	80
试剂四	100	100	100
试剂五	20	20	20
混匀，反应 2min 后，于 412nm 处读取吸光值 A。			

注：如果测定孔高于对照孔是酶活较高的表现，需要稀释样本后检测。

1. 每个待测样本都需要设定一个测定管和对照管，本试剂盒 48T 可测 20S。96T 可测 44S。

实验结果结算：

1. **标准品拟合曲线：**y=ax+b。

2. **按液体体积计算：**

酶活定义：规定每 0.1mL 血清（浆）在 37℃反应 5min，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。

GPH-Px 活力(U)=(△A-b)÷a×(0.23+V)÷(0.03+V)×0.1÷V×N

3. **组织、细菌、细胞按照蛋白计算：**

酶活定义：规定在 37℃反应 5min，扣除非酶反应的作用，使反应体系中 GSH 浓度降低 1μmol/L 为一个酶活单位。

GPH-Px 活力(U/mgprot)=(△A-b)÷a×(0.23+V)÷(0.03+V)÷(V×Cpr)×N

注：

y：标准品 OD 值-空白孔 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x：标准品浓度

a：标准曲线斜率

b：标准曲线截距

N：样本加入检测体系之前的稀释倍数

0.1÷V：酶活定义中 0.1mL 血清(浆)的酶活，样本用量 VmL

△A：对照孔 OD 值-测定孔 OD 值

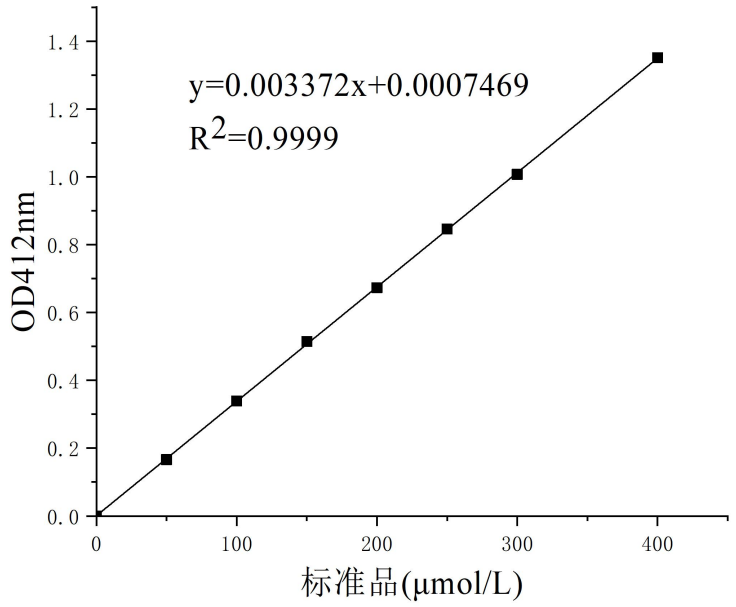
Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL

V：样本加样量，0.02mL

(0.23+V)÷(0.03+V)：酶促反应体系被稀释的倍数

参考曲线：

y=0.003372x+0.0007469，R^2=0.9999，x 是标准品的浓度（μmol/L），y 是△A。



注意：本图仅供参考，应以每次实验数据所绘制标准曲线计算样本含量。