

谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒(微板法)

产品简介:

谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione Peroxidase, GSH-Px)是一种含硒的水溶性四聚体蛋白酶, 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的变化, 该酶可以清除活细胞内过氧化物, 在保护细胞免受自由基损伤过程中起着关键作用, 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不仅具有消除自由基和衍生物的作用, 还与过氧化氢酶(CAT)、磷脂氢过氧化物谷胱甘肽过氧化物酶(PH-GSH-Px)、谷胱甘肽 S 转移酶(GST)构成不同基质特异性的多水平的还原有机氢过氧化物系统, 减少脂质过氧化物的形成, 增强机体抗氧化损伤能力。

谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒(Glutathione Peroxidase Assay Kit)的检测原理是 GSH-Px 可以促使过氧化氢(H_2O_2)与还原型谷胱甘肽(GSH)反应生成 H_2O 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量, 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, 由于这两个底物在没有酶的条件下, 也能进行氧化还原反应(称为非酶促反应), 所以最后计算此酶活力时必须扣除非酶促反应引起的 GSH 减少的部分。而 GSH 含量的测定可以跟据 GSH 和 5,5'-二硫代对硝基苯甲酸(DTNB)作用生成稳定黄色的 5-硫代-2-硝基苯甲酸阴离子, 在 412nm 处测其吸光度变化即可测出谷胱甘肽过氧化物酶的活力。该试剂盒仅用于科研领域, 不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

名称 \ 编号	ADS067TE0 100T	Storage
试剂(A): 样品匀浆液	50ml	RT
试剂(B): GSH	15.4mg	4°C
试剂(C): GSH 配制液	10ml	RT
试剂(D): 氧化剂	2 × 1ml	4°C 避光
试剂(E): 酸性沉淀剂	50ml	RT
试剂(F): GSH-Px Assay Buffer	15ml	RT
试剂(G): 苯甲酸显色液	3ml	-20°C 避光
试剂(H): ddH ₂ O	50ml	RT
使用说明书	1 份	

自备材料:

1、生理盐水或 PBS、离心管、1.5ml EP 管、96 孔板、酶标仪、水浴锅或恒温箱、离心机

操作步骤(仅供参考):

1、样本处理:

①血清、血浆样本: 从待测样本中分离出的血清或血浆不应有溶血, 如果含有, 应去除红细胞后检测, 如超过检测范围, 用生理盐水稀释后检测。血清去除红细胞的简易方法如下: 用抗凝管收集血液, 颠倒混匀, 取至少 500 μ l 全血, 4 $^{\circ}$ C 3000r/min 离心 5min, 弃上清, 用预冷的 10 倍体积的样品匀浆液重悬红细胞沉淀, 再次 4 $^{\circ}$ C 3000r/min 离心 5min, 弃上清, 加入约 4 倍体积预冷的 ddH₂O 裂解红细胞沉淀, 12000 r/min 离心 5min, 取上清; 亦可采用 ACK 红细胞裂解液等去除红细胞, 取上清。

②组织样本: 动物用含有 20U/ml Heparin 的生理盐水(0.9% NaCl containing 20U/ml Heparin)灌流清除血液后获取组织样品, 按照每 20mg 组织加入 200 μ l 样品匀浆液的比例, 用玻璃匀浆器在 4 $^{\circ}$ C或冰浴匀浆, 4 $^{\circ}$ C 12000 r/min 离心 10min, 取上清。

③细胞样本: 对于贴壁细胞, 由于后续用于酶活性的测定, 避免使用胰酶消化细胞, 可用细胞刮或 EDTA 处理细胞收集细胞, 细胞用 PBS 或生理盐水洗涤 1 次, 按照每 10⁶ 细胞加入 300~500 μ l 匀浆液的比例用玻璃匀浆器在 4 $^{\circ}$ C或冰浴匀浆, 4 $^{\circ}$ C 12000 r/min 离心 10min, 取上清, 用于酶活性的测定; 亦可采用 RAPI 裂解液, 参考相应说明裂解细胞样品, 按照每 10⁶ 细胞加入 100~200 μ l 裂解液的比例进行裂解, 取上清。④植物样本: 称取 0.2g 新鲜样品或-80 $^{\circ}$ C冻存的样品, 放入预冷的研钵中, 加入 2ml 预冷的磷酸缓冲液(0.05M, pH7.0), 在冰浴上研磨或匀浆, 转入离心管, 4 $^{\circ}$ C 12000r/min 离心 10~15min, 取上清, 用于酶活性的测定。

2、GSH 工作液的配制: 取 0.5ml ddH₂O 加入 15.4mg GSH 中, 充分溶解并混匀, 即获得 GSH 储存液(100mmol/L), 立即分装后 -20 $^{\circ}$ C 保存, 取适量的 GSH 储存液(100mmol/L), 按 GSH 配制液: GSH 储存液(100mmol/L) = 99: 1 的比例混合, 即为 GSH 工作液(1mmol/L), 该溶液配制好以后可 4 $^{\circ}$ C 保存 1 天。

3、氧化工作液的配制: 准确取氧化剂 0.1ml 加入 6.5ml ddH₂O, 即为氧化储存液(100 $\times$), 4 $^{\circ}$ C 保存, 临用前准确取氧化储存液(100 $\times$)0.1ml 加入 9.9ml ddH₂O, 即为氧化工作液; 4 $^{\circ}$ C 保存, 1 天有效。

4、GSH-Px 酶促反应: 参考下表, 用离心管设置空白对照管、光照对照管、测定管, 并按下表设置检测反应体系, 依次加入试剂:

加入物质(ml)	空白对照管	光照对照管	测定管
GSH 工作液(1mmol/L)	—	0.02	0.02
待测样品	—	—	0.02
ddH ₂ O	0.02	0.02	—
混匀, 置于 37 $^{\circ}$ C 水浴 5min。			

氧化工作液(提前 37℃预温)	—	0.01	0.01
混匀, 置于 37℃水浴 5min。			
酸性沉淀剂	0.08	0.2	0.2
3500g 离心 10min。			
取上清液		0.1	0.1

5、GSH-Px 显色反应: 参考下表, 用 96 孔板或离心管设置空白对照孔/管、光照对照孔/管、测定孔/管, 并按下表设置检测反应体系, 依次加入试剂:

加入物质(ml)	空白对照孔/管	本底对照孔/管	测定孔/管
取上清液	—	0.1	0.1
空白对照	0.1	—	—
GSH-Px Assay Buffer	0.125	0.125	0.125
苯甲酸显色液	0.025	0.025	0.025

6、GSH-Px 测定: 混匀, 置于室温孵育 1min, 以 ddH₂O 调零, 用酶标仪检测 422nm 处吸光度(即为 $A_{\text{空白}}$ 、 $A_{\text{本底}}$ 、 $A_{\text{测定}}$); 如果用酶标仪 96 孔板每孔应加 250 μ l; 如果用分光光度计, 比色杯光径应为 1cm, 加入的量应根据比色杯的最小量程而定; 经测定, 一般情况下 $A_{\text{空白}}$ 在 0.003~0.05 之间, $A_{\text{本底}}$ 在 0.1~0.3 左右。

计算:

谷胱甘肽过氧化物酶活力单位的定义: 排除非酶促反应, 在 37℃, 每 1L 血清, 1min 内可以催化 1 μ mol GSH 氧化所需(减少)的酶量为一个 GSH-Px 活性单位。

$$\text{GSH-Px(U/L)} = (A_{\text{本底}} - A_{\text{测定}}) / (A_{\text{本底}} - A_{\text{空白}}) \times 200$$

式中: $A_{\text{空白}}$ = 空白对照的吸光度

$A_{\text{本底}}$ = 本底对照的吸光度

$A_{\text{测定}}$ = 待测样品的吸光度

$$200 = 1000(\text{ml}) / 5(\text{min})$$

注: a.[检测体系中谷胱甘肽过氧化物酶活力]的单位为 U/L = mU/ml。

b.[样品(如组织样本)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] $\times$ [稀释倍数] / [样品中的蛋白浓度]

[样品中(如组织样本)谷胱甘肽过氧化物酶活力]的单位为: U/mg 或 mU/mg 蛋白

[样品中的蛋白浓度]的单位为: mg/ml。

c.计算示例: 样品的蛋白浓度经测定为 0.5mg/ml, 稀释 2 倍后进行测定。一般情况下, $A_{\text{空白}}$ 在 0.003~0.05 之间, $A_{\text{本底}}$ 在 0.1~0.3 左右。如果 $A_{\text{本底}} = 0.30$, $A_{\text{测定}} = 0.20$, $A_{\text{空白}} = 0.003$ 那么:

样本 GSP-Px 活力 $= (0.30 - 0.20) / (0.30 - 0.003) \times 200 = 67.34 \text{ U/L}$

样本 GSP-Px 活力 $= 67.34 \text{ U/L} \times 2 / (0.5 \text{ mg/ml}) = 269.36 \text{ mU/mg(蛋白)}$

参考区间：成年人血清 GSP-Px：115~140 U/L

注意事项：

- 1、上述低温试剂避免反复冻融，以免失效或效率下降。
- 2、本法中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。
- 3、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浓度过氧化物的去垢剂。
- 4、样品取出后最好立即测定，也可以-80℃冻存待以后测定。
- 5、一定要严格控制反应时的温度，否则会引起较多误差。
- 6、试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。
- 7、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期：12 个月。低温运输，按要求保存。