

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。

Leagene 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒(Glutathione Peroxidase Assay Kit)是一种以过氧化氢为底物，通过比色法检测细胞、组织或其它样品中谷胱甘肽过氧化物酶活性的试剂盒。绝大部分细胞内的谷胱甘肽过氧化物酶都是含硒的，且硒为该酶的活性中性组成部分，细胞内也有很少量的不含硒的谷胱甘肽过氧化物酶存在，本试剂盒检测的是最常见的含硒的谷胱甘肽过氧化物酶，该检测法的缺点谷胱甘肽过氧化物酶可以利用还原型谷胱甘肽(GSH)催化过氧化氢以及许多有机过氧化物，产生水或有机醇，在特殊情况下会影响检测准确性，硒是 GSH-Px 的必须组成部分，每分子该酶含有含有四分分子硒，该酶的活性中心是硒半胱氨酸，测定该酶的活力可以衡量有机体硒水平，其检测原理是：GSH-Px 可催化谷胱甘肽(GSH)与苯甲酸显色液发生氧化反应，使之生成黄色阴离子，通过酶标仪检测 422nm 处吸光度值测定该阴离子的浓度，间接推算 GSH 减少的量。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	TE0700 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
- 2、离心管、1.5ml EP 管
- 3、96 孔板、酶标仪
- 4、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,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,再次离心 5min,弃上清,加入约 4 倍体积预冷的 ddH₂O 裂解红细胞沉淀,离心 5min,取上清;亦可采用 Leagene 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,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,离心 10min,取上清,用于酶活性的测定;亦可采用 Leagene 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,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°C水浴			
氧化工作液(提前 37°C预温)	—	0.01	0.01
混匀, 置于 37°C水浴			
酸性沉淀剂	0.08	0.2	0.2
3500g 离心。			
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 Leagene 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°C, 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(ml)/5(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 0.10~0.3 左右。如果 $A_{\text{本底}} = 0.30$, $A_{\text{测定}} = 0.20$,

$A_{\text{空白}} = 0.003$ 那么:

液体样本 GSP-Px 活力 = $(0.30 - 0.2) / (0.30 - 0.003) \times 200 \times 2 = 134.7 \text{ U/L}$

组织样本 GSP-Px 活力 = $134.7 \text{ U/L} \times 2 / (0.5 \text{ mg/ml}) = 538.8 \text{ mU/mg(蛋白)}$

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°C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 个月有效。低温运输, 按要求保存。