谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒(比色法)

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 AssayKit)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，该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，通过分光光度计或酶标仪检测 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:

编号 / 名称	GCTE0701 50T	Storage
试剂(A): 样品匀浆液	50ml	RT
试剂(B): GSH	15.4mg	4℃
试剂(C): GSH 配制液	10ml	RT
试剂(D): 氧化剂	2×1ml	4℃ 避光
试剂(E): 酸性沉淀剂	100ml	RT
试剂(F): GSH-Px Assay Buffer	62.5ml	RT
试剂(G): 苯甲酸显色液	15ml	-20℃ 避光
试剂(H): ddH_2O	50ml	RT
使用说明书	说明书	

自备材料:

1、生理盐水或 PBS

2、离心管或 EP 管

3、分光光度计、比色皿

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 500μl 全血,4℃ 3000r/min 离心 5min,弃上清,用预冷的的 10 倍体积的样品匀浆液重悬红细胞沉淀,再次 4℃ 3000r/min 离心 5min,弃上清,加入约 4 倍体积预冷的 ddH_2O 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 200μl 样品匀浆液的比例,用玻璃匀浆器在 4℃或冰浴匀浆,4℃ 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 10^6 细胞加入 300~500μl 匀浆液的比例用玻璃匀浆器在 4℃或冰浴匀浆,4℃ 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 10^6 细胞加入 100~200μl 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℃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℃,12000r/min 离心 10~15min,取上清,用于酶活性的测定。

2、配制 GSH 工作液:取 0.5ml ddH_2O 加入 15.4mg GSH 或 1.0ml ddH_2O 加入 30.8mg GSH 中,充分溶解并混匀,即获得 GSH 储存液(100mmol/L),立即分装后-20℃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);4℃保存,1 天有效。

3、配制氧化工作液:准确取氧化剂 0.1ml 加入 6.5ml ddH_2O,即为氧化储存液(100×),4℃保存,临用前准确取氧化储存液(100×)0.1ml 加入 9.9ml ddH_2O,即为氧化工作液;4℃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、本底对照管、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	本底对照管	测定管
GSH 工作液(1mmol/L)	—	0.2	0.2
待测样品	—	—	0.2
ddH_2O	0.2	0.2	—
混匀，置于 37℃孵育 5min。			
氧化工作液(提前 37℃预温)	—	0.1	0.1
混匀，置于 37℃孵育 5min。			
酸性沉淀剂	0.8	2	2
3500g 离心 10min。			
取上清液	—	1	1

5、 GSH-Px 显色反应: 参考下表，用离心管设置空白对照管、本底对照管、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	本底对照管	测定管
取上清液	—	1	1
空白对照	1	—	—
GSH-Px Assay Buffer	1.25	1.25	1.25
苯甲酸显色液	0.25	0.25	0.25

6、GSH-Px 测定：混匀，置于室温孵育 1min，以 ddH_2O 调零，用分光光度计或酶标仪测定 422nm 处吸光度(即为 $A_{空白}$、$A_{本底}$、$A_{测定}$)；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；如果用酶标仪，96 孔板每孔应加 250μl；经 测定，一般情况下 $A_{空白}$在 0.003~0.05 之间，$A_{本底}$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 1μmol GSH 氧化所需(减少)的酶量为一个 GSH-Px 活性单位。

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

式中：$A_{空白}$=空白对照的吸光度

$A_{本底}$=本底对照的吸光度

$A_{测定}$=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]×[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，$A_{空白}$在 0.003~0.05 之间，$A_{本底}$在 0.10~0.3 左右。如果 $A_{本底}=0.30$，$A_{测定}=0.20$，$A_{空白}=0.003$ 那么:

液体样本 GSP-Px 活力=(0.30-0.2)/(0.30-0.003)×200×2=134.7U/L

组织样本 GSP-Px 活力=134.7U/L×2/(0.5mg/ml)=538.8mU/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 个月有效。低温运输，按要求保存。

相关产品：

产品编号	产品名称
GCDC0032	Masson 三色染色液
GCDM0007	瑞氏-姬姆萨复合染色液
GCDP0013	GUS 染色液(即用型)
GCPS0013	RIPA 裂解液(强)
GCTC0699	植物总糖和还原糖检测试剂盒(DNS 比色法)
GCTC1167	尿素(Urea)检测试剂盒(脲酶波氏比色法)