

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)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	ADS067TE0 100T	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	50ml	RT
试剂(F): GSH-Px Assay Buffer	15ml	RT
试剂(G): 苯甲酸显色液	3ml	-20℃ 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、1.5mlEP管
- 3、96孔板、酶标仪
- 4、水浴锅或恒温箱
- 5、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10⁶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10⁶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、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℃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℃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×)，4℃保存，临用前准确取氧化储存液(100×)0.1ml加入9.9ml ddH₂O，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、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℃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250μl；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1μmol 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] × [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：115~140U/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TritonX-100、Tween20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。

有效期：12个月。低温运输，按要求保存。