

谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒(微板法)

产品货号: BA1823

产品规格: 100T

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检测试剂盒(Glutathione Peroxidase AssayKit)是一种以过氧化氢为底物,通过微板法检测细胞、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。细胞内也有少量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。本试剂盒仅用于科研领域,不宜用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

产品名称	100T	保存条件
试剂(A): 样品匀浆液	50ml	室温
试剂(B): GSH	15.4mg	-20℃, 避光
试剂(C): GSH 配制液	10ml	2-8℃
试剂(D): 氧化剂	2×1ml	室温
试剂(E): 酸性沉淀剂	50ml	室温
试剂(F): GSH-Px Assay Buffer	15ml	室温
试剂(G): 苯甲酸显色液	3ml	-20℃, 避光
试剂(H): ddH ₂ O	50ml	室温

自备材料:

1. 生理盐水或 PBS
2. 离心管、1.5mlEP 管或 96 孔板
3. 酶标仪
4. 水浴锅或恒温箱
5. 离心机



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

操作步骤(仅供参考):
1. 样本处理:

a.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 500ul 全血, 4°C 3000g 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, 再同前离心, 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。

b.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 200ul 样品匀浆液的比例, 用玻璃匀浆器在 4°C或冰浴匀浆。4°C, 12000g 离心 10min。取上清用于酶活性的测定。

c.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。可以使用细胞刮或 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 300-500ul 匀浆液的比例用玻璃匀浆器在 4°C或冰浴匀浆, 4°C12000g 离心 10min, 取上清用于酶活性的测定。亦可采用 Western 及 IP 细胞裂解液参考相应说明裂解细胞样品, 按照每 10⁶ 细胞加入 100-200ul 裂解液的比例进行裂解, 取上清用于酶活性的测定。

d.植物样本: 称取 0.2g 新鲜样品或-80°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°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 15.4mgGSH 中, 充分溶解开混匀, 即获得 GSH 储存液(100mmol/L), 立即分装后-20°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 的比例稀释至 1mmol/L, 即为 GSH 工作液(1mmol/L), 该溶液配制好以后可 4°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×), 4°C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°C保存, 1 天有效。

4. GSH-Px 酶促反应: 可参考下表设置检测反应体系, 依次加入试剂:

加入物质	空白对照管	光照对照管	测定管
GSH 工作液 (1mmol/L)	-	0.02ml	0.02ml
待测样品	-	-	0.02ml
ddH ₂ O	0.02ml	0.02ml	-
混匀, 置于 37°C 水浴 5min			
氧化工作液 (提前 37°C 预温)	-	0.01ml	0.01ml
混匀, 置于 37°C 水浴 5min			
酸性沉淀剂	0.08ml	0.2ml	0.2ml
3500g 离心 10min			
取上清液	-	0.1ml	0.1ml

5. GSH-Px 显色反应: 可参考下表设置检测反应体系, 依次加入试剂:

加入物质	空白对照管	本底对照管	额定管
取上清液	-	0.1ml	0.1ml
空白对照	0.1ml	-	-
GSH-Px Assay Buffer	0.125ml	0.125ml	0.125ml
苯甲酸显色液	0.025ml	0.025ml	0.025ml

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_{空白}、A_{本底}、A_{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_{空白} 在 0.003~0.05 之间, A_{本底} 在 0.1~0.3 左右。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>

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。

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

式中: $\text{A}_{\text{空白}}$ = 空白对照的吸光度

$\text{A}_{\text{本底}}$ = 本底对照的吸光度

$\text{A}_{\text{测定}}$ = 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 1 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, $\text{A}_{\text{空白}}$ 在 0.003~0.05 之间, $\text{A}_{\text{本底}}$ 在 0.10~0.3 左右。如果 $\text{A}_{\text{本底}} = 0.30$, $\text{A}_{\text{测定}} = 0.20$, $\text{A}_{\text{空白}} = 0.003$ 那么:

液体样本 GSP-Px 活力 = $(0.30 - 0.20) / (0.30 - 0.003) \times 200 \times 2 = 134.7 \text{ U/L}$

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℃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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com