

谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒(微板法)

产品编号: MA1511

规格: 100T

产品组成和保存/运输条件

产品组成	MA1511-1 100T	保存条件	有效期	运输条件
样品匀浆液	50mL	RT	自生产之日起 12 个月	湿冰运输
GSH	15.4mg	2-8℃		
GSH 配制液	10mL	RT		
氧化剂	1mL×2	2-8℃, 避光		
酸性沉淀剂	50mL	RT		
GSH-Px Assay Buffer	15mL	RT		
苯甲酸显色液	3mL	-20℃, 避光		
ddH ₂ O	50mL	RT		
说明书	1 份			

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 GSH-Px 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; GSH-Px 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(微板法)(GSH-Px Activity Assay Kit)的检测原理是 GSH-Px 可以促使过氧化氢(H₂O₂)与还原型谷胱甘肽(GSH)反应生成 H₂O 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 含量的测定可以根据 GSH 和 5,5'-二硫代对硝基苯甲酸(DTNB)作用生成稳定的黄色的 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。

自备材料

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

使用方法

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)，该溶液可在 2-8℃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×)，2-8℃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；2-8℃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(μL)	空白对照管	本底对照管	测定管
GSH 工作液(1mmol/L)	—	20	20
待测样品	—	—	20
ddH ₂ O	20	20	—
混匀，置于 37℃水浴 5min。			
氧化工作液(提前 37℃预温)	—	10	10
混匀，置于 37℃水浴 5min。			
酸性沉淀剂	80	20	20
3500×g 离心 10min。			
取上清液	—	100	100

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、本底对照孔/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(μL)	空白对照孔/管	本底对照孔/管	测定孔/管
取上清液	—	100	100
空白对照	100	—	—
GSH-Px Assay Buffer	125	125	125
苯甲酸显色液	25	25	25



6. GSH-Px 测定：混匀，置于室温孵育 1min，以 ddH₂O 调零，用酶标仪检测 412nm 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；经验证，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。

7. 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_{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 0.1~0.3 左右。如果 A_{本底}=0.30，A_{测定}=0.20，A_{空白}=0.003 那么：

样本 GSP-Px 活力=(0.30-0.20)/(0.30-0.003)×200=67.34U/L

样本 GSP-Px 活力=67.34U/L×2/(0.5mg/mL)=269.36mU/mg(蛋白)

8. 参考区间：健康成年人血清 GSP-Px：115~140 U/L

注意事项

1. 本方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。
2. 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，最好使用纯度较高且注明含较低浓度过氧化物的去垢剂。
3. 样品取出后最好立即测定，也可以-80℃冻存待以后测定。
4. 请严格控制反应时的温度，否则会引起较多误差。
5. 所有试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。低温试剂避免反复冻融，以免失效或效率下降。
6. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
7. 本产品仅限科研实验使用，禁止用于临床、食品、化妆品等非科研场景。

S260801

