

总谷胱甘肽过氧化物酶检测试剂盒

货号: RK05821

规格: 100 次

◆ 产品简介

总谷胱甘肽过氧化物酶检测试剂盒(NADPH 法) (Total Glutathione Peroxidase Assay Kit with NADPH) 是一种简单易行的通过紫外比色来检测细胞、组织或其它样品中谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GPx)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心组成部分。细胞内也有很少量的不含硒的谷胱甘肽过氧化物酶存在。本试剂盒可以定量检测出最常见的含硒的谷胱甘肽过氧化物酶和少量不含硒的谷胱甘肽过氧化物酶的总量。

本试剂盒和谷胱甘肽过氧化物酶检测试剂盒配合使用, 可以定量检测出样品中不含硒的谷胱甘肽过氧化物酶。

谷胱甘肽过氧化物酶可以清除活细胞内的过氧化物, 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可以利用还原型谷胱甘肽(GSH)还原脂类过氧化物, 从而消除自由基的毒害作用。谷胱甘肽过氧化物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上调或下调。

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。但以过氧化氢为底物进行检测会受同样可以分解过氧化氢的过氧化氢酶(Catalase)的影响, 因为过氧化氢酶的酶活性会干扰谷胱甘肽过氧化物酶的测定。本试剂盒利用了一种间接测定的方法。谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)可以催化 GSH 产生 GSSG, 而谷胱甘肽还原酶可以利用 NADPH 催化 GSSG 产生 GSH, 通过检测 NADPH 的减少量就可以计算出谷胱甘肽过氧化物酶的活力水平。在上述反应中谷胱甘肽过氧化物酶是整个反应体系的限速步骤, 因此 NADPH 的减少量和谷胱甘肽过氧化物酶的活力线性相关。

本试剂盒利用了如下的反应原理, GPx 为谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase), GR 为谷胱甘肽还原酶 (Glutathione reductase), R-OOH 为过氧化物。



本试剂盒提供的有机过氧化物试剂(Cum-OOH)在没有谷胱甘肽过氧化物酶存在的情况下不会和 GSH 产生反应, 也不会被细胞内的过氧化氢酶催化而分解。因而可以较为特异地检测出谷胱甘肽过氧化物酶的活力。

有机过氧化物试剂(Cum-OOH)不仅可以作为含硒的谷胱甘肽过氧化物酶的底物, 也可作

为不含硒的谷胱甘肽过氧化物酶的底物，因此本试剂盒可以定量检测总谷胱甘肽过氧化物酶。

本试剂盒可检测组织匀浆产物、细胞裂解产物等样品中谷胱甘肽过氧化物酶的活性。一个试剂盒可进行 100 次检测。

◆ 试剂盒包装清单

产品编号	产品名称	包装
RM02896	样品匀浆液	100mL
RM02897	谷胱甘肽过氧化物酶检测缓冲液	50mL
RM02888	谷胱甘肽还原酶	100 μ L
RM02892	NADPH	11.5mg
RM02898	还原型谷胱甘肽 (GSH)	10mg
RM02900	过氧化物试剂 (Cum-OOH)	200 μ L
—	说明书	1 份

◆ 保存条件

-20°C 保存，一年有效。NADPH 溶解后宜适当分装并-70°C 保存，4°C 可以保存一天，-20°C 保存一周后 NADPH 会降解 10%以上。GSH 配制成溶液后，适当分装后-20°C 保存。

◆ 使用方法

1. 样品的准备

a. 细胞样品的准备：对于贴壁细胞，由于后续用于酶活性的测定，应避免使用胰酶消化细胞。可以使用 EDTA 处理细胞或用细胞铲或细胞刮收集细胞。细胞用 PBS 或生理盐水洗涤一遍。后续 (a) 和 (b) 步骤可以任选其一 (优先推荐步骤 (a))：

(a) 可以用 Western 及 IP 细胞裂解液裂解细胞样品。按照每 100 万细胞加入 100-200 μ L 裂解液的比例进行裂解。如果出现裂解效果不佳的情况，可以把处在裂解液中的细胞样品用玻璃匀浆器在 4°C 或冰浴匀浆。随后 4°C，12,000g 离心 10min。取上清用于酶活性的测定。

(b) 可以用本试剂盒中的样品匀浆液，按照每 100 万细胞加入 100-200 μ L 样品匀浆液的比例用玻璃匀浆器在 4°C 或冰浴匀浆。随后 4°C，12,000g 离心 10min。取上清用于酶活性的测定。

b. 组织样品的准备：动物用含有 0.16mg/mL heparin 的生理盐水 (0.9% NaCl containing 0.16mg/mL heparin) 灌流清除血液后获取组织样品。按照约每 20mg 组织加入 200 μ L 样品匀浆液的比例，用手持式组织研磨仪或玻璃匀浆器在 4°C 或冰浴匀浆。4°C，12,000g 离心 10min。取上清用于酶活性的测定。

c. 红细胞裂解液的准备：用抗凝管收集血液，颠倒混匀。取至少 500 μ L 全血 4°C，2500g 离心 5min。弃上清，用冰冷的约红细胞沉淀 10 倍体积的样品匀浆液重悬沉淀，再 4°C，2500g

离心 5min, 弃上清。加入约红细胞沉淀 4 倍体积的冰冷的超纯水裂解红细胞。12,000g 离心 5min, 取上清。

d. 上述各种样品可以用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。通常可以先取含 1-100 μg 蛋白的样品用于谷胱甘肽过氧化物酶的检测。注: 对于 GPx 活力较高的组织样品, 含 1-10 μg 蛋白的样品可能就能满足检测需求, 而对于 GPx 活力较低的样品例如某些细胞样品, 可能需要 10-100 μg 的蛋白量。如果发现样品中谷胱甘肽过氧化物酶的活力过高, 可以用谷胱甘肽过氧化物酶检测缓冲液进行稀释。如果样品中谷胱甘肽过氧化物酶的活力过低, 则需适当加大蛋白用量。准备好的样品如果当日测定, 可以在冰浴保存, 如果日后测定可以 -70°C 冻存。

2. 试剂盒的准备工作

a. 62.5mM NADPH 溶液的配制。在本试剂盒提供的 11.5mg NADPH 中加入 220 μL 超纯水, 溶解并混匀, 即为 62.5mM NADPH 溶液。除立即使用部分外, 其余的 NADPH 溶液需适当分装后 -70°C 保存。

b. 75mM GSH 溶液的配制。在本试剂盒提供的 10mg GSH 中加入 433 μL 超纯水, 溶解并混匀, 即为 75mM GSH 溶液。除立即使用部分外, 其余的 GSH 溶液需适当分装后 -20°C 保存。

c. GPx 检测工作液的配制。根据待测定的样品数(含对照), 按照每个检测需要 40 μL GPx 检测工作液的体积配制适量的 GPx 检测工作液。配制好的 GPx 检测工作液仅限当日使用, 且需尽量在冰浴上存放。具体配制方法参考下表。

可测定样品数(含对照)	1 个样品	10 个样品	20 个样品
谷胱甘肽过氧化物酶检测缓冲液	35 μL	350 μL	700 μL
62.5mM NADPH	2 μL	20 μL	40 μL
75mM GSH	2 μL	20 μL	40 μL
谷胱甘肽还原酶	1 μL	10 μL	20 μL
GPx 检测工作液	40 μL	400 μL	800 μL

d. 30mM 过氧化物试剂溶液的配制。取 21.5 μL 过氧化物试剂(Cum-OOH)加入 5mL 超纯水, 混匀, 即配制成 30mM 过氧化物试剂溶液。配制好的 30mM 过氧化物试剂溶液仅限当日使用, 且需尽量在冰浴上存放。

e. 所有试剂使用前须在水浴中或 PCR 仪等设备上温育到 25°C 。

3. 样品测定

a. 参考下表, 使用 96 孔板, 依次加入检测缓冲液、待测样品和 GPx 检测工作液, 混匀, 加入 40 μL GPx 检测工作液后, 室温孵育 15min, 以消耗掉样品中的 GSSG, 排除对后继检测的干扰。

	空白对照(blank)	样品(sample)
谷胱甘肽过氧化物酶检测缓冲液	50 μ L	0-50 μ L
待测样品	—	0-50 μ L
GPx 检测工作液	40 μ L	40 μ L
总体积	90 μ L	90 μ L

b. 每孔加入 10 μ L 30mM 过氧化物试剂溶液，混匀。

c. 立即使用适当的酶标仪或微量紫外分光光度计测定 A_{340} ，此时记录为 0min 读值。如果仪器可以设置温度，把温度设置在 25°C，否则可以通过空调调节室温到 25°C，待预计仪器也达到 25°C 后再开始测定 A_{340} 。

d. 连续测定 5min 或自动每隔 1min 测定一次 A_{340} 。如果仪器不具备相应功能，可以手工操作，每隔 1min 记录 A_{340} 值，至少连续记录 5min，获得 6 个点的数据。

注 1: 连续测定的时间可以根据样品中 GPx 的活力来调整，但是需确保获得 6 个点的数据。对于 GPx 的活力较高的样品，例如肝脏等组织样品，建议测定 5min 或 10min，对应的测定间隔时间设为 1min 和 2min；对于 GPx 的活力很低的样品，例如 THP-1 等细胞样品，可以延长测定时间为 10、15 或者 20min，对应的测定间隔时间设为 2、3 或 4min。也可以连续测定 20min，每隔 1min 测定 1 次，最后取呈线性的时间点前的数据用于分析。

注 2: 如果样品的第一次读数比如 0min 时 A_{340} 读值低于 1，说明样品中的 GPx 活力太高，或者样品中本身的 GSSG 含量太高，需要将样品适当稀释或者减少样品的用量。

e. 测定出来的 $\Delta A_{340}/\text{min}$ 最好能控制在 0.01-0.2 范围内。如测定出来的 $\Delta A_{340}/\text{min}$ 数值过大，则可以把样品适当稀释或者减小样品的用量，如 $\Delta A_{340}/\text{min}$ 数值过小，处理样品时需设法尽量浓缩样品、并适当加大样品的用量。蛋白量为 12 μ g 的 THP-1 细胞样品和蛋白量为 4 μ g 的小鼠肝脏样品的检测效果参考表 1、表 2 和图 1。

表 1. 蛋白量为 12 μ g 的 THP-1 细胞样品检测数据分析。

读值	0min	3min	6min	9min	12min	15min
A_{340} (blank)	1.50	1.35	1.22	1.08	0.96	0.86
A_{340} (sample)	1.44	1.21	0.98	0.72	0.50	0.32
ΔA_{340} (blank)	0	0.15	0.28	0.42	0.54	0.64
ΔA_{340} (sample)	0	0.23	0.46	0.72	0.94	1.12
ΔA_{340}	0	0.08	0.18	0.30	0.40	0.48
$\Delta A_{340}/\text{min}$	0	0.0267	0.03	0.033	0.033	0.032

表 2. 蛋白量为 4 μ g 的小鼠肝脏样品检测数据分析。

读值	0min	1min	2min	3min	4min	5min
A_{340} (blank)	1.72	1.62	1.57	1.51	1.49	1.46
A_{340} (sample)	1.37	1.12	0.95	0.79	0.62	0.45
ΔA_{340} (blank)	0	0.10	0.15	0.21	0.23	0.26
ΔA_{340} (sample)	0	0.25	0.41	0.58	0.75	0.92
ΔA_{340}	0	0.15	0.26	0.37	0.52	0.66
$\Delta A_{340}/\text{min}$	0	0.15	0.13	0.123	0.13	0.132

注: ΔA_{340} (blank) = A_{340} (blank) (Time 0) - A_{340} (blank) (Time n)

ΔA_{340} (sample) = A_{340} (sample) (Time 0) - A_{340} (sample) (Time n)

$\Delta A_{340} = \Delta A_{340}$ (sample) - ΔA_{340} (blank)

$\Delta A_{340}/\text{min} = \Delta A_{340}/n$

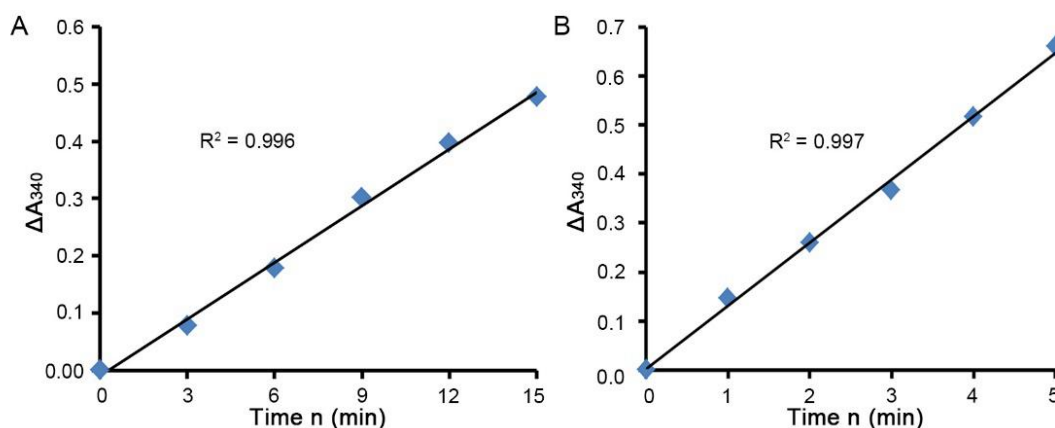


图 1. 本试剂盒用于 THP-1 细胞样品和小鼠肝脏样品的检测效果图。横坐标为测定的各个时间点 n, 纵坐标为相应时间点 ΔA_{340} (sample) 与 ΔA_{340} (blank) 的差值即 ΔA_{340} 。图 A 为 12 μ g THP-1 细胞样品测定 15min 的检测效果, 图 B 为 4 μ g 小鼠肝脏样品测定 5min 的检测效果。实测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

4. 样品中谷胱甘肽过氧化物酶酶活力的计算:

a. 谷胱甘肽过氧化物酶活力单位的定义: 1 个酶活力单位(1 unit)在 25°C, pH8.0, 在 GSH、谷胱甘肽还原酶、Cum-OOH 存在的条件下, 在 1min 内可以催化 1 μ M NADPH 转变成 NADP⁺。1 U=1000 mU。

b. 对于谷胱甘肽过氧化物酶溶液: $1\text{mU/mL} = 1\text{nmol NADPH/min/mL} = (\Delta A_{340}/\text{min}) / (\epsilon \mu\text{M} \times L(\text{cm}))$

即相当于: [检测体系中谷胱甘肽过氧化物酶活力] = $(\Delta A_{340}/\text{min}) / (\epsilon \mu\text{M} \times L(\text{cm}))$

[样品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 $]/[\text{样品中的蛋白浓度}] = [(\Delta A_{340} / \text{min}) / (\epsilon \mu \text{M} \times L(\text{cm}))] \times [\text{dil} \times (V(\text{mL}) / V_{\text{sample}}(\text{mL}))] / [\text{样品中的蛋白浓度}]$

注：[检测体系中谷胱甘肽过氧化物酶活力]的单位为 mU/mL，[样品中的蛋白浓度]的单位为 mg/mL，所以最终[样品中谷胱甘肽过氧化物酶活力]的单位为：U/mg 蛋白或 mU/mg 蛋白；

$\epsilon \mu \text{M}$ 为摩尔消光系数：NADPH 在 A_{340} 的摩尔消光系数为 $0.00622 \mu \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ；

$L(\text{cm})$ 为测吸光度时的路径长度：100 μL 样品在一般的 96 孔中的高度约为 0.276cm，如果使用不同的反应孔，请注意修改为溶液在该孔中的高度；

dil 为样品的稀释倍数；

$V(\text{mL})$ 为反应体系，本反应体系为 0.1mL；

$V_{\text{sample}}(\text{mL})$ 为反应体系中样品的体积，以 mL 表示。

c. 计算示例：样品的蛋白浓度经测定为 1.2mg/mL，用样品稀释液稀释 2 倍后，取 20 μL 稀释后的样品参考表 1 进行测定，测定时间设为 15min。如果 0min 时的 $A_{340}(\text{sample})=1.44$ ， $A_{340}(\text{blank})=1.50$ ，15min 时的 $A_{340}(\text{sample})=0.32$ ， $A_{340}(\text{blank})=0.86$ ，则 $\Delta A_{340}(\text{sample})=1.44-0.32=1.12$ ， $\Delta A_{340}(\text{blank})=1.50-0.86=0.64$ ，那么：

[检测体系中谷胱甘肽过氧化物酶活力] = $[(1.12-0.64)/15] / (0.00622 \times 0.276) = 18.64 \text{mU/mL}$

[样品中谷胱甘肽过氧化物酶活力] = $18.64 \text{mU/mL} \times (2 \times 0.1/0.02) / (1.2 \text{mg/mL}) = 155 \text{mU/mg}(\text{蛋白})$

◆ 注意事项

1. 本试剂盒检测时涉及氧化还原反应，因此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，最好使用纯度较高并注明含较低过氧化物的去垢剂。

3. 加入过氧化物试剂溶液后的第一次读数，例如 0min 时 A_{340} 读值不宜低于 1。如果读数低于 1，说明样品中的 GPx 活力太高，或者样品中本身的 GSSG 含量太高，需要将样品适当稀释或者减少样品的用量，否则反应很快就进入平台期，无法获取正常的检测数据。样品可以立即测定，也可以 -70°C 冻存待以后测定。

4. 一定要严格控制反应时的温度为 25°C ，否则会引起较多误差。

5. NADPH 不太稳定，要严格按照后续说明操作，谨防失活。

6. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。

7. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。