

组织细胞含硒谷胱甘肽过氧化物酶检测试剂盒

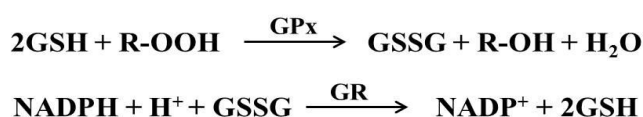
E2012

描述: 组织细胞含硒谷胱甘肽过氧化物酶检测试剂盒是一种简易的利用紫外比色法检测谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 活性的试剂盒。GPx 包括含硒和不含硒的两类, 绝大部分细胞内的 GPx 是含硒的。本试剂盒检测的是最常见的含硒的 GPx。

GPx 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中发挥重要作用。细胞内的脂质易与自由基发生反应, 生成脂质过氧化物。GPx 可以利用还原型谷胱甘肽 (GSH) 还原脂质过氧化物, 从而消除自由基的毒害作用。GPx 在各种组织中都有分布, 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。本试剂盒检测 GPx 线性范围为 31-1000mU/ml, 灵敏度 ≤ 31mU/ml。

原理: GPx 催化 GSH 转变为 GSSG, 并还原过氧化物。谷胱甘肽还原酶 (GR) 可以利用 NADPH 还原 GSSG 为 GSH。

反应示意图如下:



本试剂盒合并两个反应, 并通过检测 NADPH 减少量计算 GPx 活性, NADPH 可以通过测定 A_{340nm} 方便定量。本试剂盒提供的有机过氧化物试剂 (t-Bu-OOH) 在没有 GPx 存在的情况下不会和 GSH 发生反应, 也不会被细胞内过氧化氢酶催化分解。因而可以较为特异地检测出谷胱甘肽过氧化物酶的活力。

适用: 本试剂盒能够检测培养细胞、实体动物组织等多种生物样本中的 GPx 活性

所需设备: 酶标仪, 最佳工作波长 340nm

组成:

组份名称	规格	数量
谷胱甘肽过氧化物酶检测缓冲液	50ml/瓶	1
样品稀释液	50ml/瓶	1
组织细胞裂解液	100ml/瓶	
还原型谷胱甘肽 (GSH)	12mg/管	1
谷胱甘肽还原酶 (GR)	150μl/管	1
NADPH	15 mg/管	1
过氧化物试剂 (t-Bu-OOH)	200 μl/管	1
谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx)	50μl/管	1

储存条件: -20℃ 储存, 一年有效。NADPH 配制成溶液后, 可适当分装, -70℃ 储存。GSH 溶解后, -20℃ 储存。

操作步骤:

1. 样品的准备

1.1 细胞样品的准备: 收集新鲜细胞, PBS 洗涤细胞一次, 离心收集细胞, 吸尽上清。加入 200 μl 细胞裂解液裂解细胞, 冰浴 30 分钟。4℃, 10000g 离心 10 分钟。取上清进行蛋白浓度定量后用于谷胱甘肽过氧化物酶活性的测定。不立即测定的样品可以 -70℃ 保存。如果样品中谷胱甘肽过氧化物酶活性超出测定范围, 可利用谷胱甘肽过氧化物酶检测缓冲液适当稀释后测定, 稀释倍数请通过预实验确定。

1.2 组织样品的准备: 利用含 1mM EDTA 的 PBS 灌流或漂洗组织, 去除组织中的血液, 然组织样品约 20 mg, 加入细胞裂解液 400 μ l, 冰浴匀浆。4 $^{\circ}$ C, 10000g 离心 10 分钟。取上清进行蛋白浓度定量后用于谷胱甘肽过氧化物酶活性的测定。不立即测定的样品可以-70 $^{\circ}$ C 保存。如果样品中谷胱甘肽过氧化物酶活性超出测定范围, 可利用谷胱甘肽过氧化物酶检测缓冲液适当稀释后测定, 稀释倍数请通过预实验确定。

2. 试剂盒的准备

2.1 GSH 储备液的配制: 在本试剂盒提供的 12 mg GSSG 中加入 1ml 的纯水, 溶解并混匀, 即为 GSH 储备液, 浓度为 40 mM。

2.2 NADPH 储备液的配制: 在本试剂盒提供的 15mg NADPH 中加入 0.9ml 纯水, 溶解并混匀, 即为 NADPH 储备液, 浓度为 20 mM。

2.3 谷胱甘肽过氧化物酶检测工作液的配制: 根据待测样品数参考下表配制适当量的谷胱甘肽过氧化物酶检测工作液, 表中试剂按比例混合后即为谷胱甘肽过氧化物酶检测工作液。

	1 个样品	10 个样品	50 个样品
谷胱甘肽过氧化物酶检测缓冲液	124 μ l	1.24ml	6.2ml
GSH 储备液	10 μ l	100 μ l	500 μ l
NADPH 储备液	5 μ l	50 μ l	250 μ l
谷胱甘肽还原酶 (GPx)	1 μ l	10 μ l	50 μ l

2.4 过氧化物工作液的配制: 取 20 μ l 过氧化物试剂 (t-Bu-OOH) 加入 5ml 纯水中, 混匀, 然后根据需要取部分 t-Bu-OOH 水溶液, 利用谷胱甘肽过氧化物酶检测缓冲液稀释 10 倍, 即为过氧化物工作液。

注: 稀释过的过氧化物水溶液或过氧化物工作液可冰浴保存请勿超过 6 h。

3. 标准品的准备

将 20mM 的 NADPH 储备液用谷胱甘肽过氧化物酶检测缓冲液稀释成 500、250、125、62.5、31.2、15.6 μ M 浓度的 NADPH 溶液, 用于标准曲线测定。在本试剂盒相同反应体系下 NADPH 标准曲线只需要测定 1 次。

4. 测定方法

4.1 NADPH 标准曲线测定: 利用上述系列浓度 NADPH 标准品, 各取 200 μ l 到 96 孔板中, 各孔加入 NADPH 量分别为 100、50、25、12.5、6.2、3.1 nM, 测定 A_{340nm}。

4.2 参考下表, 使用 96 孔板, 依次加入谷胱甘肽还原酶检测工作液、样品后, 混匀, 25 $^{\circ}$ C 或室温孵育 2 分钟。

	空白对照	阳性对照	样品对照	样品
谷胱甘肽过氧化物酶检测工作液	0 μ l	140 μ l	140 μ l	140 μ l
谷胱甘肽过氧化物酶	—	1 μ l	—	—
样品	—	—	10 μ l	10 μ l
样品稀释液	151 μ l	10 μ l	1 μ l	1 μ l
25 $^{\circ}$ C 孵育	2 min	2 min	2 min	2 min
过氧化物工作液	50 μ l	50 μ l	—	50 μ l
谷胱甘肽过氧化物酶检测缓冲液	—	—	50 μ l	—
25 $^{\circ}$ C 孵育	20 min	20 min	20 min	20 min

4.3 各孔加入过氧化物工作液 50 μ l, 25 $^{\circ}$ C 孵育 20 分钟。

4.4 各孔加入过氧化物工作液 50 μ l 启动谷胱甘肽过氧化物酶反应后, 立即开始计时, 并在 2.5、5、10、20 分钟等时间点测定 A_{340nm}。如果样品吸光度下降过快, 可适度稀释样品后测定; 如果样品吸光度下降过慢, 可适当延长反应时间进行样品测定。

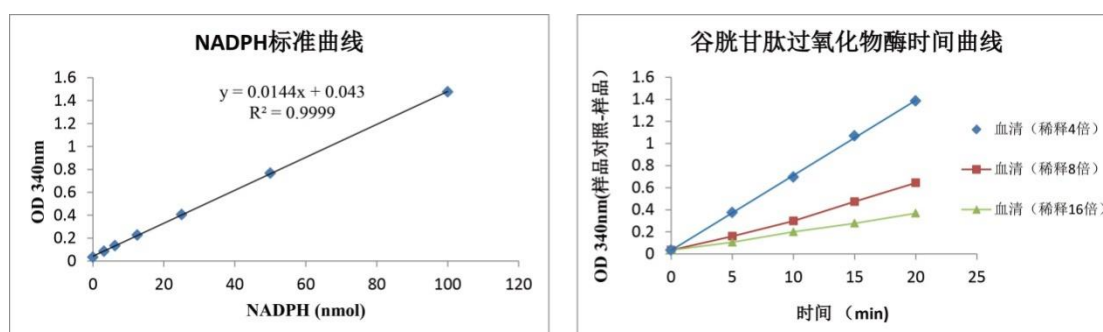
5. 数据处理

利用 NADPH 标准品的量为横坐标, 吸光度值为纵坐标制作标准曲线, 并获得横纵坐标之间的函数关系式, 然后利用各样品的吸光度值计算样品中剩余的 NADPH 量, 从而换算为谷胱甘肽过氧化物酶活力。对于细胞和组织样品, 可以根据样品中蛋白浓度测定, 计算每毫克蛋白中谷胱甘肽过氧化物酶活力。由于有多个时间点的测定, 可以选择时间线性良好的时间段计算谷胱甘肽过氧化物酶活力。

谷胱甘肽过氧化物酶定义: 在 25 $^{\circ}$ C, pH 7.2 条件下, 每分钟将 1.0 μ mol 的还原型谷胱甘肽氧化为氧化型谷胱甘肽的谷胱甘肽过氧化物酶为 1 U, 1 U=1000 mU。

计算公式: 酶活力(mU)=NADPH 生成量 (nmol) *2/反应时间(min)。

NADPH 标准曲线及小鼠血清谷胱甘肽过氧化物酶反应的时间曲线测定如下图所示:



参考文献

1. Ursini, F., Maiorino, M., and Gregolin, C., 1985. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biophys. Acta.* 839, 62-70.
2. Forstrom, J.W., Zakowski, J.J., and Tappel, A.L., 1978. Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. *Biochemistry* 17, 2639-2644.

注意事项

1. 本试剂盒检测涉及氧化还原反应, 很多氧化剂和还原剂都会干扰试剂盒的测定, 特别是巯基乙醇、DTT 等含有巯基的试剂会严重干扰本试剂盒的测定; 如果样品中这些还原剂无法避免, 则这些还原剂总浓度在反应体系中须低于 0.1 mM。
2. 为消除样品中含有的可以消耗 NADPH 的酶的干扰, 每个样品可以设置不加过氧化物试剂的样品对照。
3. 严格控制反应的温度和反应时间, 样品中酶活性过低时, 可适当延长反应时间。
4. NADPH 标准曲线只需测定 1 次即可, 主要用于酶标板测定体系下校正吸光系数, 传统文献报道的 NADPH 吸光系数适用于分光光度计测定。
5. NADPH 在溶液中容易分解, 要严格按储存条件保存。
6. 初次使用试剂盒时, 粉末试剂和小体积液体试剂请适当离心后使用。
7. 本产品仅限专业人员用于科学研究, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品。
8. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。