

## 谷胱甘肽过氧化物酶检测试剂盒(DTNB法)

产品编号	产品名称	包装
S0057S	谷胱甘肽过氧化物酶检测试剂盒(DTNB法)	100次

### 产品简介:

- 谷胱甘肽过氧化物酶检测试剂盒(DTNB法) (Cellular Glutathione Peroxidase Assay Kit with DTNB)是碧云天自行研制的一种简单易行的通过比色法来检测细胞、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。碧云天研发的DTNB法和传统的NAPDH法(S0056)相比, 吸光度变化范围更大, 有效改善了检测灵敏度和线性范围, 能更有效地对Gpx进行酶活性定量分析。
- 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。**本试剂盒检测的是最常见的含硒的谷胱甘肽过氧化物酶。**
- 本试剂盒和总谷胱甘肽过氧化物酶检测试剂盒(S0059S)配合使用, 可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。参考下图, 在GSH相对比较充足并有足量有机过氧化物存在的情况下, 谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)可以催化GSH生成GSSG。如果谷胱甘肽过氧化物酶的用量在适当的范围内并成为反应的限速因素, 就会有适量的GSH剩余, 剩余的GSH可以和生色底物DTNB反应产生GSSG和黄色的TNB。此时, 谷胱甘肽过氧化物酶活性的高低就决定了剩余的GSH的量, 从而决定了黄色TNB形成的量, 因此TNB的形成量和谷胱甘肽过氧化物酶的活力负相关。从而通过测定黄色TNB的吸光度就可以计算出谷胱甘肽过氧化物酶的活性。本试剂盒具体反应原理见下图, GPx为谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase), R-OOH为过氧化物, TNB为黄色产物。



图 1.碧云天研制的 谷胱甘肽过氧化物酶检测试剂盒(DTNB 法)的检测原理图。

- 本试剂盒提供的有机过氧化物试剂(t-Bu-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。
- 由于t-Bu-OOH不能被不含硒的谷胱甘肽过氧化物酶所催化, 所以本试剂盒可以比较特异地定量检测最常见的含硒的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。

### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
S0057S-1	样品匀浆液	100ml
S0057S-2	谷胱甘肽过氧化物酶检测缓冲液	50ml
S0057S-3	还原型谷胱甘肽(GSH)	4.5mg
S0057S-4	DTNB	4.5mg
S0057S-5	DMSO	1.5ml
S0057S-6	过氧化物试剂(t-Bu-OOH)	200μ l
—	说明书	1份

### 保存条件:

-20°C保存, 一年有效。GSH和DTNB在配制成溶液后, 需适当分装, -20°C保存至少3个月有效。

### 注意事项:

- 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。
- 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。
- 反应体系中加入DTNB溶液后，可以在极短的时间内消耗掉剩余的GSH，使GPx催化的反应终止。因此计算酶活力时，仅使用DTNB加入之前的反应时间来进行计算即可。
- 样品可以立即测定，也可以-80°C冻存待以后测定。
- 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。
- 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。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 使用说明：

### 1. 样品的准备：

- 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(FLFT021/FSCP023/FSCP029)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))：
  - 可以用碧云天生产的Western及IP细胞裂解液(P0013)参考相应说明裂解细胞样品。按照每100万细胞加入100-200微升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，12,000×g离心10分钟。取上清用于酶活性的测定。
  - 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微升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，12,000×g离心10分钟。取上清用于酶活性的测定。
- 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)灌注清除血液后获取组织样品。按照约每20mg组织加入200微升样品匀浆液的比例，用TissueMaster™手持式组织研磨仪(E6600)或玻璃匀浆器在4°C或冰浴匀浆。4°C，12,000×g离心10分钟。取上清用于酶活性的测定。
- 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微升全血4°C 2500×g离心5分钟。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，再同前离心，弃上清。加入约红细胞沉淀4倍体积的冰冷的Milli-Q级纯水裂解红细胞。12,000×g离心5分钟，取上清。
- 上述各种样品可以用碧云天生产的BCA蛋白浓度测定试剂盒(P0009/P0010/P0010S/P0011/P0012/P0012S)测定蛋白浓度。通常可以先取含1-100微克蛋白的样品用于检测，对于GPx活力较高的组织样品，含1-10微克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微克的蛋白量。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-80°C冻存。

### 2. 试剂盒的准备工作：

- 10mM GSH溶液的配制：在本试剂盒提供的4.5mg GSH中加入1.5毫升Milli-Q级纯水或双蒸水，溶解并混匀，即为10mM GSH溶液。除立即待用部分外，其余GSH储备液适当分装后-20°C保存。
- DTNB储备液的配制：在本试剂盒提供的4.5mg DTNB中加入1.5毫升本试剂盒提供的DMSO，溶解并混匀，即为DTNB储备液。除立即待用部分外，其余DTNB储备液适当分装后-20°C保存。
- 15mM过氧化物试剂溶液的配制。取21.5微升过氧化物试剂(t-Bu-OOH)加入10毫升Milli-Q级纯水，混匀，即配制成15mM过氧化物试剂溶液。配制好的15mM过氧化物试剂溶液仅限当日使用，且需尽量在冰浴上存放。
- 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：

- 参考下表，依次加入各溶液，混匀。须特别注意的是不同细胞或不同组织样品中谷胱甘肽过氧化物酶的活性水平差别比较大，初次检测需要适当摸索样品的用量。

	空白对照(Blank)	样品(Sample)
谷胱甘肽过氧化物酶检测缓冲液	183μ l	173~181μ l
10mM GSH溶液	5μ l	5μ l
样品	0μ l	2~10μ l
15mM过氧化物试剂溶液	12μ l	12μ l
总体积	200μ l	200μ l

- 25°C或室温孵育10-30分钟。初次检测孵育10分钟即可，如后续发现效果欠理想，可考虑把孵育时间延长到20-30分钟。
- 每孔加入6.6微升DTNB溶液，混匀。25°C或室温孵育10分钟。
- 使用酶标仪或微量分光光度计测定A<sub>412</sub>。如果样品与空白对照的吸光度非常接近，说明样品中谷胱甘肽过氧化物酶的活力过低，则需适当加大样品用量并延长步骤3b中样品与GSH和过氧化物试剂的孵育时间；如果样品与空白对照差异过大，说明样品中谷胱甘肽过氧化物酶的活力过高，则需适当稀释样品或减少样品用量。蛋白量为0-20微克的小鼠肝脏裂解液样品的实测效果图参考图2。

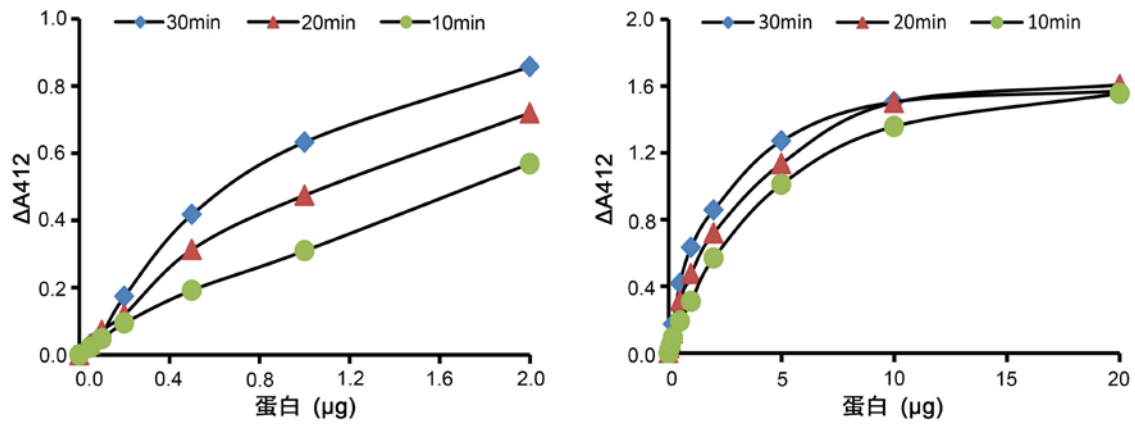


图2. 碧云天的谷胱甘肽过氧化物酶检测试剂盒(DTNB法)用于小鼠肝脏匀浆液上清样品的检测效果图。横坐标为小鼠肝脏样品的蛋白量, 纵坐标 $\Delta A_{412}$ 为加入DTNB溶液并孵育10分钟后, 空白对照减去样品的吸光度数值。孵育时间10、20、30min为步骤3b的孵育时间。左图为蛋白量0-2 $\mu$ g的结果图, 右图为蛋白量0-20 $\mu$ g的结果图。图中数据仅供参考, 实际的检测结果可能会因具体反应条件的不同而有所不同。

#### 4. 样品中谷胱甘肽过氧化物酶活力的计算:

注意: 由于加入DTNB溶液后, 可以在极短的时间内消耗掉剩余的GSH, 使GPx催化的反应终止。因此如果需要计算谷胱甘肽过氧化物酶的酶活力, 请使用步骤3b中DTNB加入之前的反应时间来进行下面的计算。

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, pH7.5的条件下, 在1分钟内可以氧化1微摩尔GSH。1U=1000mU。

b.  $\Delta A_{412}/\text{min}=[A_{412}(\text{Blank})-A_{412}(\text{Sample})]/\text{min}$

c. 对于谷胱甘肽过氧化物酶溶液:  $1\text{mU}/\text{ml}=1\text{nmol TNB}/\text{min}/\text{ml}=(\Delta A_{412}/\text{min})/(\epsilon^{\mu\text{M}} \times L(\text{cm}))$

即相当于:  $[\text{检测体系中谷胱甘肽过氧化物酶活力}]=(\Delta A_{412}/\text{min})/(\epsilon^{\mu\text{M}} \times L(\text{cm}))$

$[\text{样品中谷胱甘肽过氧化物酶活力}] = [\text{检测体系中谷胱甘肽过氧化物酶活力}] \times [\text{稀释倍数}] / [\text{样品中的蛋白浓度}] = [(\Delta A_{412}/\text{min})/(\epsilon^{\mu\text{M}} \times L(\text{cm}))] \times [\text{dil} \times (V(\text{ml})/V_{\text{sample}}(\text{ml}))] / [\text{样品中的蛋白浓度}]$

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: TNB在 $A_{412}$ 的摩尔消光系数为 $0.0136\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ;

L(cm)为测吸光度时的路径长度: 200 $\mu$ l样品在一般的96孔中的高度约为0.552cm, 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(ml)为反应体系, 本反应体系为0.2ml;

$V_{\text{sample}}(\text{ml})$ 为反应体系中样品的体积, 以毫升表示。

d. 计算示例: 样品的蛋白浓度经测定为5mg/ml, 反应步骤3b中的孵育时间为10分钟, 用样品稀释液稀释10倍后(即dil=10), 取10微升稀释后的样品(即 $V_{\text{sample}}(\text{ml})=0.01$ )参考表1进行测定。如果 $A_{412}(\text{Blank})=1.549$ ,  $A_{412}(\text{Sample})=1.221$ , 那么[检测体系中谷胱甘肽过氧化物酶活力]=  $[(1.549-1.221)/10]/(0.0136 \times 0.552)=4.369\text{mU}/\text{ml}$

$[\text{样品中谷胱甘肽过氧化物酶活力}] = 4.369\text{mU}/\text{ml} \times (10 \times 0.2/0.01)/(5\text{mg}/\text{ml})=174.76\text{mU}/\text{mg}=0.175\text{U}/\text{mg}(\text{蛋白})$

#### 相关产品:

产品编号	产品名称	包装
S0052	总谷胱甘肽检测试剂盒	100次
S0053	GSH和GSSG检测试剂盒	共100次
S0055	谷胱甘肽还原酶检测试剂盒	100次
S0056	谷胱甘肽过氧化物酶检测试剂盒	100次
S0057S	谷胱甘肽过氧化物酶检测试剂盒(DTNB法)	100次
S0058	总谷胱甘肽过氧化物酶检测试剂盒	100次
S0059S	总谷胱甘肽过氧化物酶检测试剂盒(DTNB法)	100次