



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

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
R32725-100T	谷胱甘肽过氧化物酶检测试剂盒(DTNB 法)	100T

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。DTNB法和传统的NAPDH法相比,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



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

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。

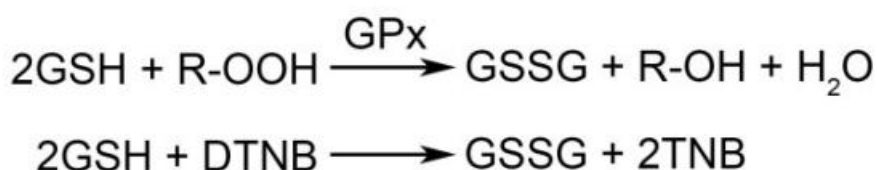


图 1.谷胱甘肽过氧化物酶检测试剂盒(DTNB 法)的检测原理图。

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
R32725-100T	样品匀浆液	100ml
	谷胱甘肽过氧化物酶检测缓冲液	50ml
	还原型谷胱甘肽(GSH)	4.5mg
	DTNB	4.5mg
	DMSO	1.5ml
	过氧化物试剂(t-Bu-OOH)	200μl
—	说明书	1 粉

保存条件:

-20℃ 保存，一年有效。



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

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:

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。



(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 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。

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 微升样品匀浆液的比例, 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, 12,000×g 离心 10 分钟。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 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。

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 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:

a. 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。

b. 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。

c. 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。

d. 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, 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	183μl	173~181μl
10mM GSH溶液	5μl	5μl
样品	0μl	2~10μl
15mM过氧化物试剂溶液	12μl	12μl
总体积	200μl	200μl

b. 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。

c. 每孔加入 6.6 微升 DTNB 溶液, 混匀。25°C 或室温孵育 10 分钟。

d. 使用酶标仪或微量分光光度计测定 A412。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。

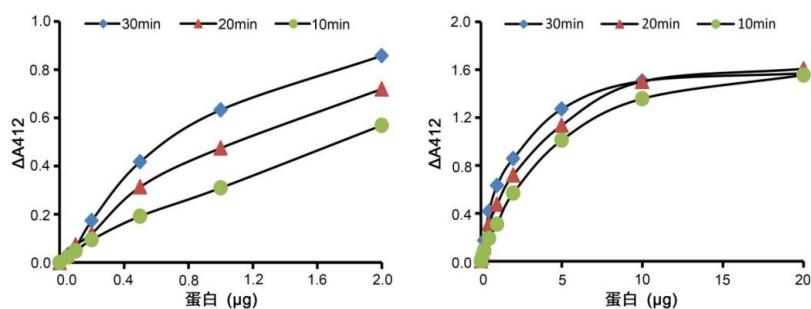


图 2. 谷胱甘肽过氧化物酶检测试剂盒(DTNB 法)用于小鼠肝脏匀浆液上清样品的检测效果图。横坐标为小鼠肝脏样品的蛋白量, 纵坐标 ΔA_{412} 为加入 DTNB 溶液并孵育 10 分钟后, 空白对照减去样品的吸光度数值。孵育时间 10、20、30min 为步骤 3b 的孵育时间。左图为蛋白量 0-2 μg 的结果图, 右图为蛋白量 0-20 μg 的结果图。图中数据仅供参考, 实际的检测结果可能会因具体反应条件的不同而有所不同。



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

[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] $\times$ [稀释倍数]/[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 A412 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 μl 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_{sample}(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_{sample}(ml)=0.01) 参考表 1 进行测定。如果 A₄₁₂(Blank)=1.549, A₄₁₂(Sample)=1.221, 那么[检测体系中谷胱甘肽过氧化物酶活力]= $[(1.549-1.221)/10]/(0.0136 \times 0.552)=4.369\text{mU}/\text{ml}$



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

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

