

EZ-Glutathione Peroxidase (GPx) Assay Kit

Oxidative Stress Assay Kit

Cat. No. DG-GPX100

FOR RESEARCH USE ONLY.

NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

▪ Product Description

Glutathione peroxidase (GPx)는 산화적 스트레스에 의한 손상으로부터 유기체를 보호하는데 중요한 역할을 하는 효소입니다.

Glutathione (GSH)은 GPx 와 과산화물(Cumene Hydroperoxide 등)에 의해 산화 형태인 GSSG 로 전환됩니다. GSSG 는 glutathione reductase (GR) 효소에 의해 다시 GSH 로 환원되는데, 이 과정에서 NADPH 를 소비하게 됩니다. 따라서 GPx 의 활성 측정은 NADPH 소비와 비례하기 때문에 NADPH 의 양을 340 nm 에서 측정하여 확인할 수 있습니다.

EZ-Glutathione peroxidase (GPx) Assay kit 는 plasma, erythrocyte lysates, tissue, homogenates, 그리고 cell lysates 등의 sample 을 이용하여 정확하게 측정할 수 있는 제품입니다.

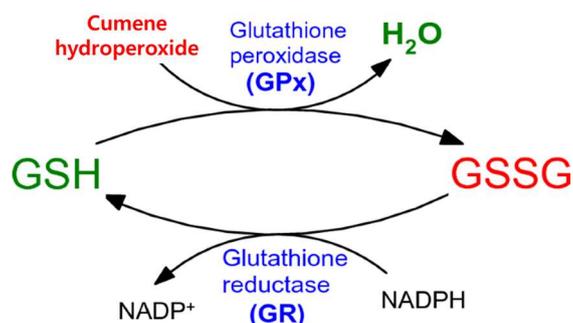


Fig. Activation mechanism of Glutathione peroxidase.

▪ Kit Contents and Storage Conditions

Component	100 assay	Storage
2X Cumene Hydroperoxide	5 ml	-20 °C
Glutathione reductase (GR)	1 vial	
Glutathione peroxidase (GPx)	1 vial	
NADPH (40mM)	1 vial	
Glutathione (GSH)	1 vial	
GPx Assay Buffer (pH 7.0)	30 ml X 2	

* 본 제품은 연구 목적으로만 사용되어야 하며, 인체용 또는 진단을 목적으로 사용되어서는 안됩니다.

* 사용 전 실온에서 충분히 놓아둔 후 사용하십시오.

▪ Preparation of Reagent

Solution	Preparation	Storage and Stability
Glutathione reductase	220 μl Assay buffer 첨가 후 잘 섞어 준 후 사용하십시오.	사용하기 직전에 희석하세요. * 희석 후 -20 °C에서 한달, 4 °C에서 일주일간 사용할 수 있습니다.
Glutathione peroxidase	110 μl Assay buffer 첨가 후 잘 섞어 준 후 사용하십시오.	
NADPH	500 μl D.W 첨가하여 잘 섞어 준 후 사용하십시오.	
Glutathione	220 μl Assay buffer 첨가 후 잘 섞어 준 후 사용하십시오.	
Cumene hydroperoxide	Assay buffer 와 1:1 로 섞어 준비한 후 사용하십시오.	

* 본 protocol 은 96-well plate 를 이용하여 실험/측정하도록 최적화 되어있습니다.

* Assay Buffer 가 완전히 녹았는지 확인 후 사용하십시오.

▪ General Protocol

Standard preparation

40mM NADPH standard solution 25 μl 와 D.W 975 μl 를 섞어 1 mM NADPH 를 제조합니다.

아래 표와 같이 1 mM NADPH 와 Assay buffer 를 섞어 total volume 을 300 μl 로 맞춰줍니다.

Standard No.	1 mM NADPH Solution	Assay buffer	Total volume	NADPH Conc. (nmol/well)
1	0 μl	300 μl	300 μl	0
2	60 μl	240 μl	300 μl	20
3	120 μl	180 μl	300 μl	40
4	180 μl	120 μl	300 μl	60
5	240 μl	60 μl	300 μl	80
6	300 μl	0 μl	300 μl	100

* Standard 는 매 실험 시 같이 측정하는 것을 권장합니다.

각 농도별로 well 에 100 μl 씩 duplicate 로 분주한 후 340 nm 에서 흡광도를 측정합니다.

Sample preparation

Note

- Standard Curve 에 모든 샘플의 농도가 포함되어야 합니다. 여러 농도의 샘플을 준비하여 실험을 진행합니다.
- Sample 은 준비 후 바로 사용하는 것을 권장하며, 바로 분석하지 않을 경우 액체 질소 나 deep freezer(-80°C)에 보관 후 한달 안에 사용하세요.
- Sample 은 ICE 위에서 실험을 진행합니다.

1. Cell (adherent or suspension) samples and Tissue Samples

- ① 각 실험에 필요한 양의 cell 을 준비합니다. (아래는 권장사항입니다. 실험환경에 맞게 진행해주세요.)
 - Cell (adherent or suspension): 2×10^6 cells
 - Tissue Sample: 100 mg
- ② 차가운 PBS 로 cell / tissue 를 세척합니다.
- ③ 차가운 Assay buffer 200 μl 를 넣어줍니다.
- ④ Ice 위에서 **여러 번 피펫팅하여** 빠르게 균질화합니다.
- ⑤ 4 °C 에서 10,000 g 로 15 min 간 centrifuge 하여 불용성 물질을 제거합니다.
- ⑥ 상층액만 새로운 tube 로 옮겨 실험에 사용합니다.
- ⑦ 바로 사용하거나 액체 질소 및 deep freezer(-80°C)에 보관 후 한달 안에 사용하세요.

2. Erythrocytes

- ① 200 μl Sample 을 차가운 Assay buffer 200 μl 로 잘 섞어줍니다.
- ② 4 °C 에서 10,000 g 로 15 min 간 centrifuge 하여 불용성 물질을 제거합니다.
- ③ 상층액만 새로운 tube 로 옮긴 후 바로 사용하거나 액체 질소 및 deep freezer(-80°C) 보관 후 한달 안에 사용하세요.

3. Plasma and serum samples

- ① Plasma/serum sample 은 전처리 과정 없이 Assay buffer 로 희석한 후 바로 측정할 수 있습니다.
- ② Sample 은 바로 사용하지 않을 때 액체 질소 및 deep freezer(-80°C)에 보관 후 한달 안에 사용하세요.

Glutathione peroxidase Assay

- ① Positive control 인 Glutathione peroxidase (GPx) solution 2 ~ 10 μl 를 well 에 분주하고, Assay buffer 로 total volume 을 50 μl 로 맞춰줍니다.
- ② Reagent Control (RC) well 은 Assay buffer 50 μl 를 넣어줍니다.
- ③ 준비한 sample 을 농도별로 50 μl 넣어줍니다.
- ④ Reaction Mixture 제조
1 assay 기준의 volume 이며, 실험에 사용하려는 assay 양을 계산하여 assay+1 만큼 reaction mix 를 준비합니다.

Components	Reaction mixture
Assay Buffer	33 μl
40 mM NADPH solution	3 μl
GR solution	2 μl
GSH solution	2 μl
Total	40 μl

- ⑤ 모든 well 에 reaction mix solution 을 40 μl 씩 첨가한 후 15 분 간 반응 후 산화된 glutathione (GSSG)를 제거합니다.
 - GSSG 가 존재하면 정확한 측정이 어려워 충분히 반응 후 진행하십시오.
- ⑥ 340 nm 에서 흡광도를 측정합니다 (A1).
 - A1 의 흡광도 값이 너무 낮으면(예: 0.7 이하) 샘플을 희석 또는 투석하거나 스피너 필터를 사용하여 샘플에서 GSSG 를 제거한 후 실험에 사용해야 합니다.
- ⑦ Cumene hydroperoxide 을 Assay buffer 와 1:1 로 섞은 solution 을 각 well 에 10 μl 씩 넣어 잘 섞은 후 상온에서 빛을 차단하여 약 5~20 분간 반응시킨 후 340 nm 에서 흡광도를 측정합니다 (A2).

▪ Calculation

- ① NADPH 의 각 농도별 흡광도 값의 평균값을 구합니다.
- ② NADPH 의 최종농도 (X 축)에 대한 O.D. 값(Y 축)을 이용하여 표준곡선을 그려 선형 방정식을 구합니다.
- ③ 모든 샘플의 평균값을 구합니다.
- ④ 샘플 평균값에서 아래 식을 활용하여 흡광도 값을 보정합니다.

$$\Delta A_{340nm} = \{(\text{Sample A1} - \text{Sample A2}) - (\text{Reagent Control A1} - \text{Reagent Control A2})\}$$

- ⑤ NADPH 선형방정식에 $\Delta 340nm$ 값을 대입하여 B 를 얻습니다.

$$B = \frac{\Delta A_{340nm} - \text{intercet}}{\text{Slope}}$$

- ⑥ 샘플의 GPx 농도는 다음과 같이 계산됩니다(nmol/min/mL = mU/mL).

$$GPx \text{ Activity} = \frac{B}{(T_2 - T_1) \times V} \times \text{Sample dilution} = \text{nmol/min/mL} = \text{mU/mL}$$

T_1 = Time of the first reading (A1) (minutes).

T_2 = Time of second reading (A2) (minutes).

V = Pretreated sample volume added into the reaction well (mL).

- Glutathione peroxidase 1 unit 은 25 °C에서 1 분 동안 NADPH 를 NADP⁺로 산화시키는 효소의 양을 말합니다.

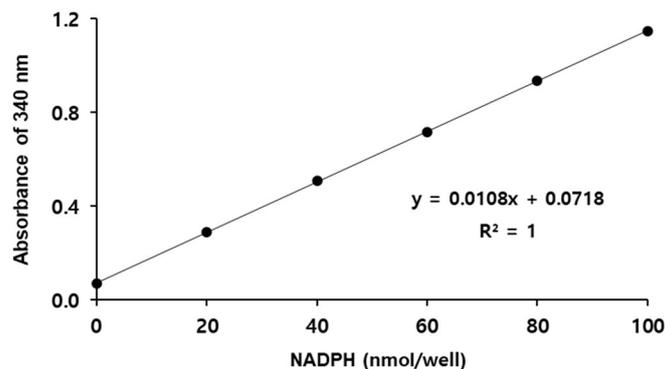


Fig. NADPH standard curve. Assay was performed following the kit protocol.

▪ Related Product

	Products	Catalog No.	Assay
Oxidative Stress Assay Kit	EZ-Superoxide Dismutase (SOD) Assay Kit (Colorimetric)	DG-SOD400	400 Assay
	EZ-Glutathione Assay Kit (Colorimetric)	DG-GLU200	200 Assay
	EZ-Catalase Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-CAT400	400 Assay
	EZ-Hydrogen peroxide/Peroxidase Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-PER500	500 Assay
	EZ-Lipid Peroxidation (TBARS) Assay Kit (Colorimetric)	DG-TBA200	200 Assay
	EZ-Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit (Colorimetric)	DG-TAC200	200 Assay
	EZ-DPPH Antioxidant Assay Kit (Colorimetric)	DG-DPH400	400 Assay
	EZ-ABTS Antioxidant Assay Kit (Colorimetric)	DG-ABT400	400 Assay
Metabolism Assay Kit	EZ-Lactate Assay Kit (Colorimetric)	DG-LAC100	100 Assay
	EZ-Acetylcholinesterase Assay Kit (Colorimetric)	DG-ACE100	100 Assay
	EZ-Ascorbic Acid Assay Kit (Colorimetric)	DG-ASC100	100 Assay
	EZ-ATP Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-ATP100	100 Assay
	EZ-Free Fatty Acid Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-FFA100	100 Assay
	EZ-Free Glycerol Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-FGC100	100 Assay
	EZ-Glucose Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-GCS100	100 Assay
	EZ-HDL, LDL/VLDL Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-CHO100	100 Assay
	EZ-Total Cholesterol Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-TSC100	100 Assay
	EZ-Triglyceride Quantification Assay Kit (Fluorometric/Colorimetric)	DG-TGC100	100 Assay
	EZ-Nitric Oxide Assay Kit (Colorimetric)	DG-NO500	500 Assay
	EZ-Total Collagen Assay Kit (Colorimetric)	DG-COL100	100 Assay
	EZ-Ethanol Assay Kit (Colorimetric)	DG-ETH100	100 Assay