

Glutathionperoxidase (GPx) MTP Assay Kit

Zur Bestimmung der GPx-Aktivität in biologischen Proben

Glutathione peroxidase (GPx) MTP Assay Kit

For the determination of GPx activity in biological samples

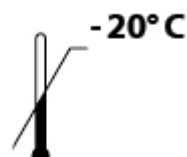
Gültig ab / Valid from 09.08.2011



K 7031



96



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 70190-0
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Info@immundiagnostik.com
www.immundiagnostik.com

Inhalt / Content

1. Deutsch
2. English

Weitere Informationen zu unseren Produkten finden Sie auf unserer
Homepage

Additional information about our products is available on our homepage

www.immundiagnostik.com

1. VERWENDUNGSZWECK

Der Glutathionperoxidase (GPx) Assay Kit ist für die Bestimmung der Glutathionperoxidase (GPx) Aktivität in biologischen Proben und in Erythrozyten-Lysaten geeignet. Nur für Forschungszwecke.

2. EINLEITUNG

Die Glutathionperoxidase (GPx) ist eines der wichtigsten antioxidativen Enzyme für die Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies in lebenden Zellen. GPx ist verantwortlich für die Aufrechterhaltung der Integrität aller Zellmembranen gegenüber Schädigungen durch oxidativen Stress. Vor allem die Lipidkomponenten der Zellmembranen werden durch freie Radikale zu Lipidperoxiden oxidiert. GPx reduziert die Peroxide mit Hilfe von Glutathion zu Alkoholen und verhindert somit die Bildung von freien Radikalen.

Die Enzyme der GPx-Familie katalysieren die Reduktion von Wasserstoffperoxiden und Lipidhydroperoxiden zu Wasser und den entsprechenden stabilen Alkoholen mit Hilfe von zellulärem Glutathion als reduzierendem Reagenz.

Die meisten zellulären Glutathionperoxidasen sind tetramere Enzyme, bestehend aus vier identischen 22 kDa Monomeren, wobei jede Untereinheit ein Selenocystein im aktiven Zentrum enthält. Das Selenocystein gibt ein Elektron direkt an das Peroxidsubstrat ab und wird dadurch oxidiert. Zudem nutzt das Enzym reduziertes Glutathion als Elektronendonator um die reduzierte Form des Selenocystein wieder zu regenerieren. Die GPx Enzyme existieren auch als nicht-Selen (nicht-Se) haltige Enzyme.

Zelluläre GPx ist in allen Geweben vorhanden; allerdings können verschiedene Krankheiten die GPx-Konzentration beeinflussen. Ein Anstieg der GPx-Konzentration wurde in Reticulozyten von diabetischen Ratten nachgewiesen. Der Spiegel normalisierte sich nach Insulin-Gabe. Eine verminderte GPx-Konzentration wurde bei Patienten mit Haarzellleukämie oder Favismus (Krankheit, assoziiert mit einer schweren hämolytischen Krise) detektiert.

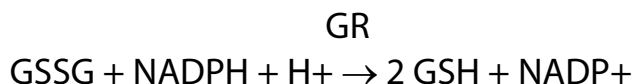
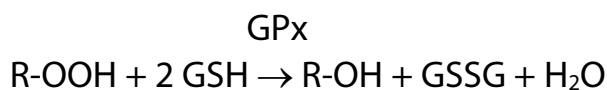
Indikation

- Detoxifikationsmarker

3. TESTPRINZIP

Der Kit benutzt eine indirekte Bestimmungsmethode. Diese basiert auf der GPx-katalysierten Oxidation von Glutathion (GSH) zu oxidiertem Glutathion (GSSG), wobei GSSG in einer gekoppelten Reaktion von Glutathionreduktase (GR) und NADPH (b-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, reduziert) wieder zu GSH reduziert wird.

Die Abnahme der NADPH-Absorption bei 340 nm während der Oxidation von NADPH zu NADP⁺ entspricht der GPx-Aktivität, da die Glutathionperoxidase der geschwindigkeitslimitierende Faktor der gekoppelten Reaktion ist:



GPx - Glutathionperoxidase, GR - Glutathionreduktase, R-OOH – organisches Peroxid.

Die Reaktion wird bei 25 °C und pH 8.0 durchgeführt und wird durch Zugabe eines organischen Peroxids, *tert*-Butylhydroperoxid (t-Bu-OOH), gestartet. Dieses Substrat eignet sich gut für den Assay, da seine spontane Reaktion mit GSH gering ist, und es wird durch Katalase nicht metabolisiert. Durch die Reaktion mit *tert*-Butylhydroperoxid wird die Aktivität der Selen-haltigen Glutathionperoxidase in der Probe ermittelt.

Falls in der Probe auch nicht-Se-haltige Enzyme vermutet werden, kann das Cumen-Hydroperoxid im Konzentrationsbereich von 0.25–1.0 mM als Substrat eingesetzt werden. Dadurch wird die totale GPx-Aktivität (Se- und nicht-Se-haltige Enzyme) bestimmt. Die Differenz zwischen den Aktivitäten erhalten mit Cumen-Hydroperoxid und *tert*-Butylhydroperoxid stellt die Aktivität der nicht-Se-haltigen Glutathionperoxidasen dar.

Eine GPx-Unit ist definiert als die Aktivität, die 1 mmol NADPH zu NADP⁺ pro Minute bei 25°C und pH 8.0 in einer gekoppelten Reaktion in Anwesenheit von reduziertem Glutathion, Glutathionreduktase und *tert*-Butylhydroperoxid umsetzt.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 7031MTP	PLATE	Mikrotiterplatte	12 x 8 wells
K 7031BU	ASYBUF	Assaypuffer	2 x 65 ml
K 7031AR	ASYREAG	Assay-Reagenz	4 x 1 vial
K 7031PER	PER	Peroxidsubstrat, <i>tert</i> -Butylhydroperoxid	100 µl

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 20 - 1000 µl
- 8-Kanalpipette (20 µl)
- Pipettierwanne
- Mikrotiterplattenlesegerät geeignet zur Kinetikmessung (zeitliche Erfassung der OD-Änderung) bei 340 nm
- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)

6. PROBENVORBEREITUNG

Die Proben mit dem ASYBUF (Assaypuffer) so verdünnen, dass ein linearer Messbereich gefunden wird. Dazu müssen verschiedene Verdünnungen ausgetestet werden. Bei Erythrozyten-Lysaten liegt der Messbereich in etwa bei einer Hämoglobinkonzentration von 70 mg/ml.

Herstellung von Erythrozyten-Lysat

Gewinnung der Erythrozyten

Vollblut in einem Röhrchen mit Antikoagulat (EDTA, Heparin oder Citrat) sammeln. Bei 3000 xg 10 Minuten zentrifugieren. Das überstehende Plasma und die weiße Schicht mit einer Pipette vorsichtig abnehmen.

Waschen der Erythrozyten (optional)

Zu den Erythrozyten wird das 5-fache Volumen 0,9 % NaCl-Lösung oder PBS (phosphate buffered saline) gegeben, mehrmalig gestürzt und bei 3000 x g 10 Minuten zentrifugiert. Der Pufferüberstand wird abgenommen und die Prozedur zweimal wiederholt.

Lysis der Erythrozyten

Die gewaschenen Erythrozyten werden mit dem 5-fachen Volumen bidest. Wasser versetzt. Es erfolgt die augenblickliche Lysis der Zellen. Anschließend 10 min bei 10000 x g zentrifugieren.

Den Überstand abnehmen und für den Test einsetzen.

Die so erhaltenen Proben können bis zur Messung bei -70°C mindestens 1 Monat aufbewahrt werden.

7. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- **ASYREAG** (Assay-Reagenz) sind stabil bei **-20 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum. Nach der Rekonstitution nicht wieder einfrieren.
- **ASYBUF** (Assaypuffer) and **PER** (Peroxidsubstrat, *tert*-Butylhydroperoxid) können aus dem Kit genommen und bei 2 - 8°C gelagert werden.
- **Herstellung von 6 ml Reaktionslösung für 24 Messungen in MTP**
1 vial ASYREAG (Assay-Reagenz) mit **6 ml ASYBUF** (Assaypuffer) rekonstituieren, 5 Minuten stehen lassen, vortexen.
- **Herstellung der Peroxidsubstratlösung**
8 µl PER (Peroxidsubstratlösung) mit **1 ml bidest. Wasser** verdünnen.

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Plattenbelegung auf Versuchsprotokoll vermerken.

Wichtig: jede Reihe benötigt ein neues Blank.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Pipettierschema

20 µl Probe bzw. ASYBUF (Assaypuffer) für den Blank in die entsprechenden Kavitäten vorlegen
Je 200 µl der ASYREAG (Reaktionslösung) zugeben
Kinetikprogramm für die Messung der Absorption bei 340 nm am Mikrotiterplattenlesegerät einrichten, wenn möglich Temperierung auf 25°C. Kinetikprogramm: Initial delay: 15 S Intervall: 10 S Anzahl der Messungen: 12
In eine Pipetierwanne eine ausreichende Menge PER (Peroxidsubstratlösung) ansetzen
Je 20 µl PER (Peroxidsubstratlösung) pro Vertiefung zugeben. Es wird empfohlen dazu eine 8-Kanalpipette zu benutzen, um zeitliche Verzögerungen zu minimieren
Messung starten
Zur Auswertung wird die delta OD bzw. die Steigung zwischen 15–120 S herangezogen. Die Zeiten und Intervalle können variiert werden; auf jeden Fall ist im linearen Bereich der Enzymkinetik zu messen.

9. ERGEBNISSE

Auswertung

Die Abnahme der Absorption bei 340 nm [$\Delta A_{340}/\text{min}$] ist direkt proportional zur GPx Aktivität.

Blank und Probe

$$\Delta A_{340}/\text{min} = A_{340\text{nm}}(\text{Start}) - A_{340\text{nm}}(\text{Stop}) / \text{Reaktionszeit (min)}$$

$$\Delta OD = \Delta A_{340}/\text{min}_{\text{Probe}} - \Delta A_{340}/\text{min}_{\text{Blank}}$$

GPx spezifische Aktivität

$$\Delta OD/\text{min} * V (\text{ml}) * \text{dil} / \epsilon_{\text{mM}} * V_{\text{Probe}}, \text{mmol}/(\text{min} \cdot \text{ml}) = \text{Units/ml}$$

ϵ_{mM} ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) = 4,54; Extinktionskoeffizient für NADPH bei 340 nm bei einem Endvolumen von 240 μl in Mikrotiterplatte

V (ml) = Reaktionsvolumen (0,240 ml)

V_{Probe} (ml) = Volumen der getesteten Probe (z. B. 0,020 ml)

dil = Verdünnungsfaktor der Probe

10. EINSCHRÄNKUNGEN

Fertigen Sie verschiedene Probenverdünnungen an, um Ergebnisse im linearen Bereich zu erhalten.

11. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von kommerziell erhältlichen Kontrollen (wenn vorhanden) für die interne Qualitätskontrolle.

Wir empfehlen, die Kontrollen bei jedem Testansatz mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen ein oder mehrere Werte außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Werte nicht gewährleisten.

12. VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur für Forschungszwecke.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind giftig und karzinogen. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Reagenzien nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden.
- Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien vermeiden.
- Bestimmung immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich für Forschungszwecke verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurück zu senden.

15. LITERATUR

1. Andersen HR, Nielsen JB, Nielsen F, Grandjean P (1997) Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clinical Chemistry* **43**(4):562-568
2. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Torzewski M, Hafner G, Tiret L, Smieja M, Cambien F, Meyer J, Lackner KJ (2003) Glutathione Peroxidase 1 Activity and Cardiovascular Events in Patients with Coronary Artery Disease. *New Engl J Med* **349**:1605-13
3. Carmagnol F, Sinet PM, Jerome H (1983) Selenium-dependent and non-selenium-dependent glutathione peroxidases in human tissue extracts. *Biochim Biophys Acta*. Aug 23; **759**(1-2):49-57
4. Djordjevic A, Spasic S, Jovanovic-Galovic A, Djordjevic R, Grubor-Lajsic G (2004) Oxidative stress in diabetic pregnancy: SOD, CAT and GSH-Px activity and lipid peroxidation products. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* **16**:367-372
5. Kluchová Z, Petrášová D, Joppa P, Dorková Z, Tkáčová R (2007) The Association between Oxidative Stress and Obstructive Lung Impairment in Patients with COPD. *Physiol. Res.* **56**:51-56
6. Kuku I, Aydogdu I, Bayraktar N, Kaya E, Akyol O, Erkurt MA (2005) Oxidant/antioxidant parameters and their relationship with medical treatment in multiple myeloma. *Cell Biochem Funct* **23**:47-50
7. Ladenstein R, Epp O, Bartels K, Jones A, Huber R, Wendel A (1979) Structure analysis and molecular model of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol.* Oct 25; **134**(2):199-218
8. Mavelli I, Ciriolo MR, Rossi L, Meloni T, Forteleoni G, De Flora A, Benatti U, Morelli A, Rotilio G (1984) Favism: a hemolytic disease associated with increased superoxide dismutase and decreased glutathione peroxidase activities in red blood cells. *Eur J Biochem.* Feb 15; **139**(1):13-8
9. Ridker PM, Brown NJ, Vaughan DE, Harrison DG, Mehta JL (2004) Established and Emerging Plasma Biomarkers in the Prediction of First Atherothrombotic Events. *Circulation* **109**:6-19
10. Schnabel R, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, Torzewski M, Lubos E, Bickel C, Cambien F, Tiret L, Münzel T, Blankenberg S (2005) Glutathione Peroxidase-1 and Homocysteine for Cardiovascular Risk Prediction Results from the AtheroGene Study. *J Am Coll Cardiol* **45**:1631-7
11. Thomson CD, Rea HM, Doesburg VM, Robinson MF (1977) Selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in whole blood of New Zealand residents. *Br J Nutr.* May; **37**(3):457-60

12. Wendel A, Fausel M, Safayhi H, Tiegs G, Otter R (1984) A novel biologically active seleno-organic compound-II. Activity of PZ 51 in relation to glutathione peroxidase. *Biochemical Pharmacology*. **33**(7):3241-3245
13. Zachara BA, Gromadzińska J, Wąsowicz W, Zbróg Z (2006) Red blood cell and plasma glutathione peroxidase activities and selenium concentration in patients with chronic kidney disease: A review. *Acta Biochimica Polonica* **53**(4):663–677

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



Nur für Forschungszwecke

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Glutathione peroxidase (GPx) MTP Assay Kit

For the determination of GPx activity in biological samples

Valid from 09.08.2011



K 7031



96



1. INTENDED USE

The Glutathione peroxidase (GPx) Assay Kit is intended for the measurement of total GPx activity. It can be used to measure GPx activity in biological samples and erythrocyte lysates. It is for research use only.

2. INTRODUCTION

Glutathione peroxidase (GPx) is one of the most important enzymes for detoxification of peroxides in living cells. GPx plays a crucial role in protecting cells from damage by free radicals which are formed by peroxide decomposition. Lipid components of the cell are especially susceptible to reactions with free radicals resulting in lipid peroxidation. GPx reduces peroxides to alcohols using glutathione thus preventing the formation of free radicals.

GPx enzymes catalyze the reduction of hydrogen peroxide and a wide variety of organic peroxides to water and the corresponding stable alcohols using cellular glutathione as the reducing reagent.

Most cellular glutathione peroxidases are tetrameric enzymes consisting of four identical 22 kDa monomers, each of which contains a selenocysteine in the active site. The selenocysteine participates directly in electron donation to the peroxide substrate and becomes oxidized in the process. The enzyme then uses reduced glutathione as a hydrogen donor to regenerate the selenocysteine. GPx enzymes also exist as non-selenium (non-Se) containing enzymes.

Cellular GPx is present in all tissues; however, various diseases may influence its level. An increase in the level of glutathione peroxidase has been observed in reticulocytes of diabetic rats. The level returned to normal after administration of insulin. A decrease in the level of the enzyme has been observed in patients suffering from diseases such as hairy cell leukemia or Favism (a disease associated with extreme hemolytic crisis).

Indication

- Detoxification marker

3. PRINCIPLE OF THE TEST

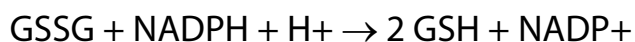
This kit uses an indirect determination method. It is based on the oxidation of glutathione (GSH) to oxidized glutathione (GSSG) catalyzed by GPx, which is then coupled to the recycling of GSSG back to GSH utilizing glutathione reductase (GR) and NADPH (b-Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, reduced).

The decrease in NADPH absorbance measured at 340 nm during the oxidation of NADPH to NADP⁺ is indicative of GPx activity, since GPx is the rate limiting factor of the coupled reactions.

GPx



GR



GPx is glutathione peroxidase, GR is Glutathione reductase, and R-OOH is an organic peroxide.

The reaction is performed at 25 °C and pH 8.0, and is started by adding an organic peroxide, *tert*-butyl hydroperoxide (t-Bu-OOH). This substrate is suitable for the assay since its spontaneous reaction with GSH is low and it is not metabolized by catalase. The reaction with *tert*-butyl hydroperoxide measures the amount of selenium-containing glutathione peroxidase activity present in the sample.

If the presence of non-Se enzymes is suspected, cumene hydroperoxide can be used as the substrate at a concentration of 0.25–1.0 mM. This will measure the total GPx (Se and non-Se enzymes) activity. The difference between the activity observed with cumene hydroperoxide activity and the *tert*-butyl hydroperoxide is the non-Se glutathione peroxidase activity.

One unit of glutathione peroxidase is defined as the activity that causes the formation of 1.0 mmol of NADP⁺ from NADPH per minute at pH 8.0 and 25°C in a coupled reaction in the presence of reduced glutathione, glutathione reductase, and *tert*-butyl hydroperoxide.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
K 7031MTP	PLATE	Microtiter plate	12 x 8 wells
K 7031BU	ASYBUF	Assay buffer	2 x 65 ml
K 7031AR	ASYREAG	Assay reagent	4 x 1 vial
K 7031PER	PER	Peroxide substrate, <i>tert</i> -butyl hydroperoxide	100 µl

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Precision pipettors and disposable tips to deliver 20 - 1000 µl
- An 8-channel dispenser (20 µl)
- Pipetting tray
- Microtiter plate reader with a kinetic program for recording the time course of the OD change at 340 nm
- Bidistilled water (aqua bidest.)

6. SAMPLE PREPARATION

Dilute the samples with ASYBUF (Assaypuffer) in such a way that a linear measuring range is ensured. Perform and test several different dilutions in order to obtain results within the linear measuring range. The measuring range for erythrocyte lysates is at hemoglobin concentration of approximately 70 mg/ml.

Preparation of erythrocyte lysates

Isolation of erythrocytes

Collect whole blood in a tube with anticoagulant (EDTA, heparin or citrate). Centrifuge at 3000 x g for 10 minutes. Transfer with a pipette carefully the overlaying plasma and the white layer to a new tube.

Washing of the erythrocytes (optionally)

Add to the erythrocytes the 5-fold volume of 0,9 % NaCl-solution or PBS (phosphate buffered saline), invert the tube several times and centrifuge at 3000 x g for 10 minutes. Remove the buffer supernatant and repeat the procedure two times.

Lysis of the erythrocytes

Add to the washed erythrocytes the 5-fold volume of bidist. water. The cell lysis follows immediately. Centrifuge at 10,000 x g for 10 minutes.

Collect supernatant and use for the assay.

The obtained samples can be stored at -70°C for at least one month before analysis.

7. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- **ASYBUF** (Assay buffer is stable at **-20 °C** until the expiry date stated on the label. After reconstitution, it cannot be frozen and stored.
- **ASYBUF** (Assay buffer) and **PER** (Peroxide substrate, *tert*-butyl hydroperoxide) can be taken out of the kit and stored at 2-8°C.
- **Preparation of 6 ml reaction solution for 24 measurements in MTP**
Reconstitute 1 vial ASYREAG (Assay reagent) with **6 ml of ASYBUF** (Assay buffer). Allow the vial content to dissolve for 5 minutes and vortex.
- **Preparation of peroxide substrate solution**
Dilute 8 µl of PER (peroxide substrate solution) with **1 ml bidist. water**.

8. ASSAY PROCEDURE

Notice the plate configuration in the protocol.

Important: a separate blank is needed for each row.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Test procedure

Add 20 µl of sample or ASYBUF (Assay buffer) for the blank in the corresponding well		
Add in each well 200 µl of ASYREAG (reaction solution)		
Set up the microtiter plate reader to measure absorbance at 340 nm; if possible, at constant temperature of 25°C.		
Kinetic program:	Initial delay:	15 S
	Interval:	10 S
	Number of readings:	12
Prepare enough of PER (peroxide substrate solution) in a pipetting tray		
Add 20 µl of PER (peroxide substrate solution) in each well. Use of 8-channel pipette is recommended to minimize time delays		
Start measurement		
For data evaluation, delta OD or absorbance increase between 15–120 S is used.		
Duration and intervals can be varied. It is important that the enzyme kinetic is measured in the linear range.		

9. RESULTS

Calculations

The decrease in absorbance at 340 nm [$\Delta A_{340}/\text{min}$] is directly proportional to the GPx activity.

Blank and sample

$\Delta A_{340}/\text{min} = A_{340\text{nm}}(\text{Start}) - A_{340\text{nm}}(\text{Stop}) / \text{Reaction time (min)}$

$\Delta OD = \Delta A_{340}/\text{min}_{\text{sample}} - \Delta A_{340}/\text{min}_{\text{blank}}$

GPx specific activity

$\Delta OD * V(\text{ml}) * \text{dil} / \epsilon_{\text{mM}} * V_{\text{Sample}}, \text{mmol}/(\text{min} \cdot \text{ml}) = \text{Units/ml}$

ϵ_{mM} ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) = 4,54; Extinction coefficient for NADPH at 340 nm for a microtiter plate with a final volume of 240 μl

$V(\text{ml}) = \text{Reaction volume (0,240 ml)}$

$V_{\text{Sample}}(\text{ml}) = \text{Volume of the tested sample (e. g. 0,020 ml)}$

$\text{dil} = \text{Dilution factor of the original sample}$

10. LIMITATIONS

Prepare different sample dilutions in order to obtain results in the linear range.

11. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG recommends the use of commercial control samples for internal quality control if available.

Control samples should be analyzed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid, if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

12. PRECAUTIONS

- For research use only.
- Quality control guidelines should be observed.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- All reagents in the kit package are for research use only.
- Guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Andersen HR, Nielsen JB, Nielsen F, Grandjean P (1997) Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clinical Chemistry* **43**(4):562-568
2. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Torzewski M, Hafner G, Tiret L, Smieja M, Cambien F, Meyer J, Lackner KJ (2003) Glutathione Peroxidase 1 Activity and Cardiovascular Events in Patients with Coronary Artery Disease. *New Engl J Med* **349**:1605-13
3. Carmagnol F, Sinet PM, Jerome H (1983) Selenium-dependent and non-selenium-dependent glutathione peroxidases in human tissue extracts. *Biochim Biophys Acta*. Aug 23; **759**(1-2):49-57
4. Djordjevic A, Spasic S, Jovanovic-Galovic A, Djordjevic R, Grubor-Lajsic G (2004) Oxidative stress in diabetic pregnancy: SOD, CAT and GSH-Px activity and lipid peroxidation products. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* **16**:367-372
5. Kluchová Z, Petrášová D, Joppa P, Dorková Z, Tkáčová R (2007) The Association between Oxidative Stress and Obstructive Lung Impairment in Patients with COPD. *Physiol. Res.* **56**:51-56
6. Kuku I, Aydogdu I, Bayraktar N, Kaya E, Akyol O, Erkurt MA (2005) Oxidant/antioxidant parameters and their relationship with medical treatment in multiple myeloma. *Cell Biochem Funct* **23**:47-50
7. Ladenstein R, Epp O, Bartels K, Jones A, Huber R, Wendel A (1979) Structure analysis and molecular model of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol.* Oct 25; **134**(2):199-218
8. Mavelli I, Ciriolo MR, Rossi L, Meloni T, Forteleoni G, De Flora A, Benatti U, Morelli A, Rotilio G (1984) Favism: a hemolytic disease associated with increased superoxide dismutase and decreased glutathione peroxidase activities in red blood cells. *Eur J Biochem.* Feb 15; **139**(1):13-8
9. Ridker PM, Brown NJ, Vaughan DE, Harrison DG, Mehta JL (2004) Established and Emerging Plasma Biomarkers in the Prediction of First Atherothrombotic Events. *Circulation* **109**:6-19
10. Schnabel R, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, Torzewski M, Lubos E, Bickel C, Cambien F, Tiret L, Münzel T, Blankenberg S (2005) Glutathione Peroxidase-1 and Homocysteine for Cardiovascular Risk Prediction Results from the AtheroGene Study. *J Am Coll Cardiol* **45**:1631-7
11. Thomson CD, Rea HM, Doesburg VM, Robinson MF (1977) Selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in whole blood of New Zealand residents. *Br J Nutr.* May; **37**(3):457-60

12. Wendel A, Fausel M, Safayhi H, Tiegs G, Otter R (1984) A novel biologically active seleno-organic compound-II. Activity of PZ 51 in relation to glutathione peroxidase. *Biochemical Pharmacology*. **33**(7):3241-3245
13. Zachara BA, Gromadzińska J, Wąsowicz W, Zbróg Z (2006) Red blood cell and plasma glutathione peroxidase activities and selenium concentration in patients with chronic kidney disease: A review. *Acta Biochimica Polonica* **53**(4):663–677

8/9/2011 26012005_GPx.DOC

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



For research use only



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number