

谷胱甘肽过氧化物酶4（GPX4） 活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

规格：50 T/24S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体50mL×1瓶	2-8℃保存
提取液二	液体0.3 mL×1支	-20℃保存
试剂一	液体60mL×1瓶	2-8℃保存
试剂二	液体0.75mL×1支	-20℃保存
试剂三	液体0.75mL×1支	2-8℃保存
试剂四	粉剂×1支	2-8℃保存
试剂五	液体0.65mL×1支	2-8℃保存
试剂六	粉剂×1支	-20℃保存
试剂七	液体80 μL×1支	2-8℃保存

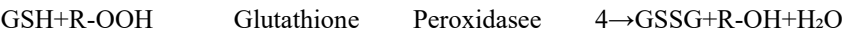
溶液的配制：

- 提取液：根据样本量将提取液一：提取液二按3.96mL:40 μL （共 4mL, 4T） 的比例配制，**3 h内有效**。
 - 试剂二工作液：根据样本量将试剂一：试剂二按0.7mL:0.1mL （共0.8mL, 4S） 的比例配制，一天内有效。
 - 试剂三工作液：根据样本量将试剂一：试剂三按0.7mL:0.1mL （共0.8mL, 4S） 的比例配制，一天内有效。
 - 试剂四：临用前加入0.326mL 蒸馏水溶解，未用完的试剂分装后2-8℃可保存4周。
 - 试剂六：临用前加入1.22mL 蒸馏水溶解，未用完的试剂分装后-20℃可保存4周，避免反复冻融。
 - 工作液的配制：根据样本量将试剂一：试剂四：试剂五：试剂六=2.86mL:20μL:40μL:80μL （共 3mL，约 4T） 的比例配制工作液，现用现配，3h 内使用有效。
 - 试剂七工作液：根据样本量将试剂一：试剂七=395 μL:5 μL （共0.4mL, 4T） 的比例配制，一天内有效。
- 注意：提取液二、试剂二、试剂三、试剂五和试剂七体积较小，使用前需用掌上离心机将试剂离心至底部。

产品说明：

谷胱甘肽过氧化物酶4 (Glutathione peroxidase 4, GPX4, EC 1.11.1.12) 是以硒化半胱氨酸为活性中心的过氧化物分解酶之一，是谷胱甘肽过氧化物酶家族的成员，它能催化谷胱甘肽 (GSH) 与过氧化物反应，将过氧化物还原成羟基化合物，从而保护细胞免受自由基损伤。

谷胱甘肽过氧化物酶催化GSH 与过氧化物反应生成氧化型谷胱甘肽 (GSSG), GSSG 在谷胱甘肽还原酶 (GR) 的作用下与NADPH 反应生成GSH, NADPH 在340nm 有特征吸收峰，反应体系吸光度值降低的速度与谷胱甘肽过氧化物酶活性线性相关，本试剂盒向反应体系中加入GPX4抑制剂，通过测定非特异性酶活和总酶活，来计算GPX4 特异性酶活。



NADPH(340nm)+H++GSSG

Glutathione Reductase

NADP++2GSH

注意：实验之前建议选择2-3个稀释倍数做预实验。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、天平、低温台式离心机、水浴锅/恒温培养箱、1mL 石英比色皿、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、可调式移液枪、EP管、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理(可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献)

1. 组织：按照组织质量(g)：提取液体积(mL) 为1:5~10的比例(建议称取约0.1g 组织，加入1mL 提取液)进行冰浴匀浆。10000g,4℃ 离心10min, 取上清置冰上待测。
2. 细菌/细胞：按照细菌/细胞数量(10⁶个):提取液体积 (mL) 为5~10:1的比例(建议5×10⁶个细菌/细胞加入 1mL 提取液),冰浴超声波破碎细菌/细胞(功率200W, 超声3秒，间隔6秒，总时间3min); 然后10000g, 4℃离心10min, 取上清置于冰上待测。
3. 血清(浆)等液体样本：直接测定。若有沉淀请离心后取上清待测。

二、测定步骤

1. 紫外分光光度计预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。
2. 工作液临用前25℃预热10min。

3. 操作表：(在1.5mLEP管/1mL石英比色皿按下表步骤加样)

试剂名称 (μL)	对照管	测定管
样本	50	50
试剂二工作液	200	—
试剂三工作液		200
混匀，37℃孵育30min, 在EP管中反应的可反应后将上述液体转移至1mL石英比色皿中继续实验		
工作液	650	650
试剂七工作液	100	100
加入试剂七工作液后充分混匀10s, 立即转入1mL石英比色皿，340nm处测定吸光值A1, 分别记为A1对照、A1测定，25℃孵育5min后，测定吸光值A2, 分别记为A2对照、A2测定。△A测定=A1测定-A2测定，△A对照=A1对照-A2对照，△A=△A测定-△A对照。每个测定管需设置一个对照管。		
注意：工作液和试剂七工作液不可提前混合实验。		

三、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4) 活性计算公式

1. 按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：在25℃条件下，每毫克蛋白在反应体系中每分钟消耗1nmol NADPH定义为一个酶活性单位。

$$\text{GPX4活性 (U/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反}}] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times F = 643.09 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \times F$$

2. 按样本质量计算

酶活定义：在25℃条件下，每克组织在反应体系中每分钟消耗1nmol NADPH定义为一个酶活性单位。

$$\text{GPX4活性 (U/g 质量)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提}}) \div T \times F = 643.09 \times \Delta A \div W \times F$$

3. 按细胞/细菌数量计算:

酶活定义: 在25℃条件下, 每10⁶个细菌/细胞在反应体系中每分钟消耗1nmolNADPH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{GPX4 活性 (U/10}^6\text{cell)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反}}] \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提}}) \div T \times F = 643.09 \times \Delta A \div N \times F$$

4. 按液体体积计算:

酶活定义: 在25℃条件下, 每毫升液体在反应体系中每分钟消耗1nmol的NADPH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{GPX4 活性 (U/mL)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反}}] \div V_{\text{样}} \div T \times F = 643.09 \times \Delta A \times F$$

ϵ : NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$; d : 1mL 石英比色皿光径, 1cm; 10^9 : 换算系数, $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$;

$V_{\text{反}}$: 反应体系体积, $1 \times 10^{-3}\text{L}$; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中样本上清液的体积, 0.05mL; $V_{\text{提}}$: 加入提取液体积, 1mL;

T : 样本反应时间, 5min; W : 样本质量, g; N : 细胞/细菌总数, 以 10^6 计; C_{pr} : 蛋白浓度, mg/mL; F : 样本稀释倍数。

注意事项:

1. 样本上清应在实验当天制备, 放冰上保存, 冻融会导致蛋白变性, 影响实验结果。
2. 样本酶活较高时测定吸光值降低速度较快, 导致 ΔA 值小, 可以用提取液稀释样本后再进行测定。
3. 如果测定吸光值降低速度较慢, 可以适当延长加入试剂七工作液后的反应时间, 注意同步修改计算公式。
4. 小鼠肝脏较优的稀释倍数为20~40倍, 小鼠肾脏较优的稀释倍数为4~10倍, 细胞和细菌不建议稀释。

实验实例:

1. 取0.105g 小鼠肝脏加入1mL 提取液进行冰浴匀浆, 离心取上清后测定蛋白含量为10.6mg/mL, 将上清用提取液稀释20倍后, 按照测定步骤操作, 使用1mL 石英比色皿测得 $\Delta A_{\text{测定}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}} = 1.700 - 1.162 = 0.538$,
 $\Delta A_{\text{对照}} = A1_{\text{对照}} - A2_{\text{对照}} = 1.733 - 1.256 = 0.477$, $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{对照}} = 0.538 - 0.477 = 0.061$, 按样本蛋白含量计算酶活得:

$$\text{GPX4 活性 (U/mg prot)} = 643.09 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \times F = 74.02 \text{ U/mg prot}$$

2. 取0.107g 小鼠肾脏加入1mL 提取液进行冰浴匀浆, 离心取上清后测定蛋白含量为8.68mg/mL, 将上清用提取液稀释10倍后, 按照测定步骤操作, 使用1mL 石英比色皿测得 $\Delta A_{\text{测定}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}} = 1.656 - 1.183 = 0.473$,
 $\Delta A_{\text{对照}} = A1_{\text{对照}} - A2_{\text{对照}} = 1.694 - 1.249 = 0.445$, $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{对照}} = 0.473 - 0.445 = 0.028$, 按样本蛋白含量计算酶活得:

$$\text{GPX4 活性 (U/mg prot)} = 643.09 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \times F = 20.74 \text{ U/mg prot}$$

参考文献:

[1]Liu H,Forouhar F,Seibt T,Saneto R,Wigby K,Friedman J,Xia X,Shchepinov MS,Ramesh SK,Conrad M, Stockwell BR.Characterization of a patient-derived variant of GPX4 for precision therapy.Nat Chem Biol.2022 Jan;18(1):91-100.doi:10.1038/s41589-021-00915-2.

[2]Stolwijk JM,Falls-Hubert KC,Searby CC,Wagner BA,Buettner GR.Simultaneous detection of the enzyme activities of GPx1 and GPx4 guide optimization of selenium in cell biological experiments.Redox Biol.2020 May;32:101518.doi:10.1016/j.redox.2020.101518.

[3]Liu H,Forouhar F,Lin AJ,Wang Q,Polychronidou V,Soni RK,Xia X,Stockwell BR.Small-molecule allosteric inhibitors of GPX4.Cell Chem Biol.2022 Dec 15;29(12):1680-1693.e9.doi:10.1016/j.chembiol.2022.11.003.

相关产品：

BC1190/BC1195	谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px/GPX)	活性检测试剂盒
BC1170/BC1175	还原型谷胱甘肽 (GSH)	含量检测试剂盒
BC1180/BC1185	氧化型谷胱甘肽 (GSSG)	含量检测试剂盒
BC6270/BC6275	总谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px/GPX)	活性检测试剂盒