

谷胱甘肽过氧化物酶4（GPX4） 活性检测试剂盒说明书

微量法

规格：100 T/48S

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70mL×1瓶	2-8℃保存
提取液二	液体0.6 mL×1支	-20℃保存
试剂一	液体24mL×1瓶	2-8℃保存
试剂二	液体0.32mL×1支	-20℃保存
试剂三	液体0.32mL×1支	2-8℃保存
试剂四	粉剂×1支	2-8℃保存
试剂五	液体0.23mL×1支	2-8℃保存
试剂六	粉剂×1支	-20℃保存
试剂七	液体30 μL×1支	2-8℃保存

溶液的配制：

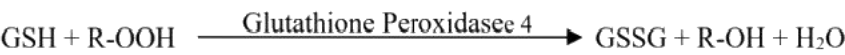
1. 提取液：根据样本量将提取液一：提取液二按3.96mL:40μL （共 4mL,4T） 的比例配制，3 h 内有效。
2. 试剂二工作液：根据样本量将试剂一：试剂二按140 μL:20μL （共160 μL,4S） 的比例配制，一天内有效。
3. 试剂三工作液：根据样本量将试剂一：试剂三按140 μL:20 μL （共160 μL, 4S） 的比例配制，一天内有效。
4. 试剂四：临用前加入0.163 mL 蒸馏水溶解，未用完的试剂2-8℃可保存4周。
5. 试剂六：临用前加入0.531mL 蒸馏水溶解，未用完的试剂-20℃可保存4周，避免反复冻融。
6. 工作液的配制：根据样本量将试剂一：试剂四：试剂五：试剂六=572 μL:4μL:8μL:16μL （共0.6mL, 约 4T） 的比例配制工作液，现用现配，3h内使用有效。
7. 试剂七工作液：根据样本量将试剂一：试剂七=79 μL:1 μL （共80 μL, 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/酶标仪、天平、低温台式离心机、水浴锅/恒温培养箱、微量石英比色皿/96孔UV板、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/酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，紫外分光光度计蒸馏水调零。
2. 工作液临用前25℃预热10min。
3. 操作表：(在96孔UV板/微量石英比色皿/EP管中按下表步骤加样)：

试剂名称(μL)	对照管	测定管
样本	10	10
试剂二工作液	40	—
试剂三工作液		40
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96孔UV板/微量石英比色皿中继续实验		
工作液	130	130
试剂七工作液	20	20
加入试剂七工作液后充分混匀10s，立即在340nm处测定吸光值A ₁ ，分别记为A ₁ 对照、A ₁ 测定，25℃孵育5min后，测定吸光值A ₂ ，分别记为A ₂ 对照、A ₂ 测定。ΔA测定=A ₁ 测定-A ₂ 测定，ΔA对照=A ₁ 对照-A ₂ 对照，ΔA=ΔA测定-ΔA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. 使用96孔UV板测定

(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。

$$\text{GPX4活性 (U/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反}}] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times F = 1071.81 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \times F$$

(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。

$$\text{GPX4 活性 (U/g 质量)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提}}) \div T \times F = 1071.81 \times \Delta A \div W \times F$$

(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。

$$\text{GPX4 活性(U/10}^6\text{cell)}=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反}}] \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提}}) \div T \times F = 1071.81 \times \Delta A \div N \times F$$

(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。

$$\text{GPX4 活性 (U/mL)}=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反}}] \div V_{\text{样}} \div T \times F = 1071.81 \times \Delta A \times F$$

8:NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10³ L/(mol·cm);d:96 孔UV板光径, 0.6cm;10⁹: 换算系数, 1mol=10⁹nmol;

V 反: 反应体系体积, 2×10⁻⁴L;V 样: 加入反应体系中样本上清液的体积, 0.01mL;V 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10⁶计; Cpr: 蛋白浓度, mg/mL;F: 样本稀释倍数。

2. 使用微量石英比色皿测定

(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。

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

(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。

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

8:NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10³ L/(mol·cm);d: 微量石英比色皿光径, 1cm;10⁹: 换算系数, 1mol=10⁹nmol;

V 反: 反应体系体积, 2×10⁻⁴L;V 样: 加入反应体系中样本上清液的体积, 0.01mL;V 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10⁶计; Cpr: 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0.100g 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12.38mg/mL，将上清用提取液稀释20倍后，按照测定步骤操作，使用96孔UV 板测得ΔA测定=A1测定-A2 测定=0.799-0.506=0.293，

ΔA 对照=A1 对照-A2 对照=0.792-0.540=0.252, ΔA=ΔA 测定-ΔA 对照=0.293-0.252=0.041, 按样本蛋白含量计算酶活得：

GPX4 活性(U/mg prot)= $1071.81 \times \Delta A \div Cpr \times F = 70.99$ U/mg prot

2. 取0.101g 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7.83mg/mL，将上清用提取液稀释10倍后，按照测定步骤操作，使用96孔UV 板测得 ΔA 测定=A1测定-A2 测定=0.730-0.532=0.198， ΔA 对照=A1 对照-A2 对照=0.727-0.541=0.186， $\Delta A = \Delta A$ 测定- ΔA 对照=0.198-0.186=0.012, 按样本蛋白含量计算酶活得：

GPX4 活性 (U/mg prot)= $1071.81 \times \Delta A \div Cpr \times F = 16.43$ U/mg prot

3. 取HEK293T 细胞 10×10^6 个，加入0.5mL 提取液进行冰浴匀浆，离心取上清后测定蛋白含量为4.191mg/mL，按照测定步骤操作，**延长反应时间为15min**，使用96孔UV 板测得 ΔA 测定=A1测定-A2 测定=0.859-0.251=0.608, ΔA 对照=A1 对照-A2 对照=0.841-0.297=0.544， $\Delta A = \Delta A$ 测定- ΔA 对照=0.608-0.544=0.064, 按样本蛋白含量计算酶活得：

GPX4 活性 (U/mg prot)=[$\Delta A \div (e \times d) \times 10^9 \times V$ 反] \div (Cpr $\times V$ 样) $\div T \times F = 5.46$ U/mg prot