

谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)活性检测试剂盒（微量法）

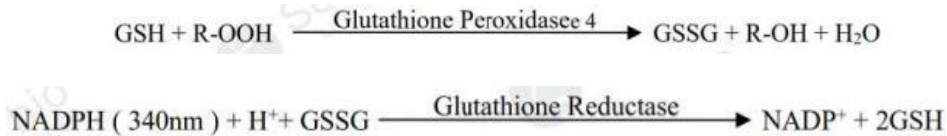
产品货号：BA3462

产品规格：100T/48S

产品简介：

谷胱甘肽过氧化物酶4(Glutathione peroxidase4, GPX4, EC1.11.1.12)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。



产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体70mL×1瓶	2-8℃
提取液二	液体0.6mL×1支	-20℃
试剂一	液体24mL×1瓶	2-8℃
试剂二	液体0.32mL×1支	-20℃
试剂三	液体0.32mL×1支	2-8℃
试剂四	粉剂×1支	2-8℃
试剂五	液体0.23mL×1支	2-8℃
试剂六	粉剂×1支	-20℃
试剂七	液体30μL×1支	2-8℃

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，3h 内有效。
2. 试剂二工作液：根据样本量将试剂一：试剂二按 140μL:20μL(共 160μL，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 140μL:20μL(共 160μL，4S)的比例配制，一天内有效。
4. 试剂四：临用前加入 0.163mL 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=572μL：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=79μL:1μL(共 80μL，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。

所需的仪器和用品：

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)，



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

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°C 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°C 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°C 孵育 1h, 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 A1, 分别记为 A1 对照、A1 测定, 25°C 孵育 5min 后, 测定吸光值 A2, 分别记为 A2 对照、A2 测定。ΔA 测定 = A1 测定 - A2 测定, ΔA 对照 = A1 对照 - A2 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°C 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。

$$\text{GPX4 活性 (U/mg prot)} = [\Delta A \div (\xi \times d) \times 10^9 \times V \text{ 反}] - (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T \times F = 1071.81 \times \Delta A \div \text{Cpr} \times F$$

(2) 按样本质量计算:

酶活定义: 在 25°C 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。

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

(3) 按细胞/细菌数量计算:

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

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

(4) 按液体体积计算:

酶活定义: 在 25°C 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。

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

ξ: NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10³L/(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°C 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。

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

(2) 按样本质量计算:

酶活定义: 在 25°C 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。

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



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzybio@126.com

(3) 按细胞/细菌数量计算:

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

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

(4) 按液体体积计算:

酶活定义: 在 25°C 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。

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

ξ : 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, $\Delta A = \Delta A$ 测定- ΔA 对照=0.293-0.252=0.041, 按样本蛋白含量计算酶活得:

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

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:

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

3. 取 HEK293T 细胞 10 × 10⁶ 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:

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



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com