

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

货号: BC6260

规格: 50T/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, 有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 50 mL×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 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 0.75 mL×1 支	-20℃保存
试剂三	液体 0.75 mL×1 支	2-8℃保存
试剂四	粉剂×1 支	2-8℃保存
试剂五	液体 0.65 mL×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:

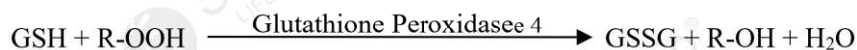
1. 提取液: 根据样本量将提取液一: 提取液二按 3.96mL: 40 μL (共 4mL, 4T) 的比例配制, **3h 内有效**。
2. 试剂二工作液: 根据样本量将试剂一: 试剂二按 0.7mL: 0.1mL (共 0.8mL, 4S) 的比例配制, 一天内有效。
3. 试剂三工作液: 根据样本量将试剂一: 试剂三按 0.7mL: 0.1mL (共 0.8mL, 4S) 的比例配制, 一天内有效。
4. 试剂四: 临用前加入 0.326 mL 蒸馏水溶解, 未用完的试剂分装后 2-8℃可保存 4 周。
5. 试剂六: 临用前加入 1.22 mL 蒸馏水溶解, 未用完的试剂分装后 -20℃可保存 4 周, 避免反复冻融。
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=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。
7. 试剂七工作液: 根据样本量将试剂一: 试剂七=395μL: 5μL (共 0.4mL, 4T) 的比例配制, 一天内有效。

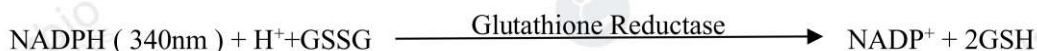
注意: 提取液二、试剂二、试剂三、试剂五和试剂七体积较小, 使用前需用掌上离心机将试剂离心至底部。

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。





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。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. 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°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。

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

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。

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

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

V反: 反应体系体积, 1×10⁻³L; V样: 加入反应体系中样本上清液的体积, 0.05mL; 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 0.105g 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 ΔA 测定=A1 测定-A2 测定=1.700-1.162=0.538, ΔA 对照=A1 对照-A2 对照=1.733-1.256=0.477, $\Delta A = \Delta A$ 测定- ΔA 对照=0.538-0.477=0.061, 按样本蛋白含量计算酶活得:

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

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 ΔA 测定=A1 测定-A2 测定=1.656-1.183=0.473, ΔA 对照=A1 对照-A2 对照=1.694-1.249=0.445, $\Delta A = \Delta A$ 测定- ΔA 对照=0.473-0.445=0.028, 按样本蛋白含量计算酶活得:

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

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

