

## 谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)活性检测试剂盒（微量法）

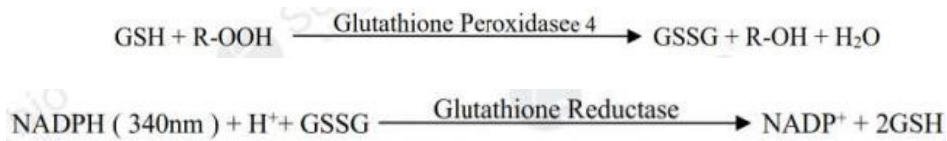
产品货号：BA3462

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)



扫一扫 加微信

**上海尚宝生物科技有限公司**  
 Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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( $10^6$  个)：提取液体积(mL)为 5-10:1 的比例(建议  $5 \times 10^6$  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 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℃ 孵育 5min 后，测定吸光值 A2，分别记为 A2 对照、A2 测定。 $\Delta A_{测定} = A1_{测定} - A2_{测定}$ ， $\Delta A_{对照} = A1_{对照} - A2_{对照}$ ， $\Delta A = \Delta A_{测定} - \Delta A_{对照}$ 。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. 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。

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

#### (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。

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

#### (3) 按细胞/细菌数量计算：

酶活定义：在 25℃ 条件下，每  $10^6$  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。

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

#### (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。

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

$\xi$ ：NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ ；d：96 孔 UV 板光径，0.6cm； $10^9$ ：换算系数， $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ ；V 反：反应体系体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；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  $10^6$  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



扫一扫 加微信

**上海尚宝生物科技有限公司**  
 Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路 2518 弄 14 号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

(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。

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

(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。

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

(3) 按细胞/细菌数量计算:

酶活定义: 在 25°C 条件下, 每 10<sup>6</sup> 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。

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

(4) 按液体体积计算:

酶活定义: 在 25°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。

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

$\epsilon$ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22 × 10<sup>3</sup> L/(mol·cm); d: 微量石英比色皿光径, 1cm; 10<sup>9</sup>: 换算系数, 1mol=10<sup>9</sup>nmol;

V 反: 反应体系体积, 2 × 10<sup>-4</sup>L; 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 10<sup>6</sup> 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  $\Delta A$  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  $\Delta A$  测定=A1 测定-A2 测定=0.799-0.506=0.293,  $\Delta A$  对照=A1 对照-A2 对照=0.792-0.540=0.252,  $\Delta A = \Delta A$  测定- $\Delta A$  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  $\Delta A$  测定=A1 测定-A2 测定=0.730-0.532=0.198,  $\Delta A$  对照=A1 对照-A2 对照=0.727-0.541=0.186,  $\Delta A = \Delta A$  测定- $\Delta A$  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 × 10<sup>6</sup> 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  $\Delta A$  测定=A1 测定-A2 测定=0.859-0.251=0.608,  $\Delta A$  对照=A1 对照-A2 对照=0.841-0.297=0.544,  $\Delta A = \Delta A$  测定- $\Delta A$  对照=0.608-0.544=0.064, 按样本蛋白含量计算酶活得:

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



扫一扫 加微信

**上海尚宝生物科技有限公司**  
 Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com