

谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)活性检测试剂盒 (紫外分光光度法)

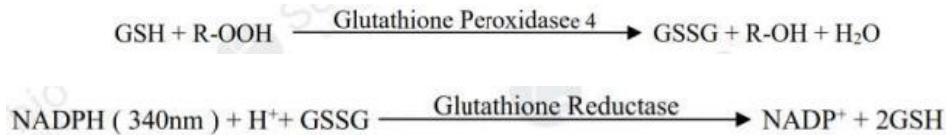
产品货号: BA3463

产品规格: 50T/24S

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50mL×1瓶	2-8℃
提取液二	液体0.3mL×1支	-20℃
试剂一	液体60mL×1瓶	2-8℃
试剂二	液体0.75mL×1支	-20℃
试剂三	液体0.75mL×1支	2-8℃
试剂四	粉剂×1支	2-8℃
试剂五	液体0.65mL×1支	2-8℃
试剂六	粉剂×1支	-20℃
试剂七	液体80μL×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 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 0.326mL 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 1.22mL 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=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。



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

所需的仪器和用品:

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°C 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 5×10^6 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°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. 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
2. 工作液临用前 25°C 预热 10min。
3. 操作表: (在 1.5mL EP 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°C 孵育 1h, 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°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) 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。

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

(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。

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

(3) 按细胞/细菌数量计算:

酶活定义: 在 25°C 条件下, 每 10^6 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。

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

(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。



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

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, $6.22 \times 10^3 \text{L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$; d: 1mL 石英比色皿光径, 1cm; 10^9 : 换算系数, $1 \text{mol} = 10^9 \text{nmol}$;
V 反: 反应体系体积, $1 \times 10^{-3} \text{L}$; V 样: 加入反应体系中样本的体积, 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 10^6 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:

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

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:

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



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>