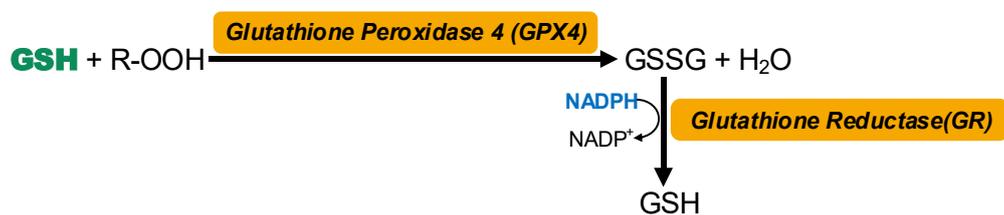




谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 活性检测试剂盒
Glutathione Peroxidase 4 (GPX4) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 活性检测试剂盒

Glutathione Peroxidase 4 (GPX4) Activity Assay Kit

一、产品描述

谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 是以硒化半胱氨酸为活性中心的过氧化物分解酶之一。谷胱甘肽过氧化物酶 4 可催化还原型谷胱甘肽 (GSH) 与过氧化物反应, 将细胞内的过氧化氢 (H_2O_2) 以及脂质过氧化物 (R-OOH) 还原为对应的羟基化合物 (R-OH), 从而保护生物膜免受 ROS 的损害, 维持膜的完整性和细胞的正常功能, 是“铁死亡”的关键酶。

谷胱甘肽过氧化物酶可催化 H_2O_2 氧化还原型谷胱甘肽 (GSH) 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。GPX4 抑制剂通过抑制 GPX4 活性从而降低 NADPH 的消耗速率, NADPH 在 340 nm 处具有特征吸收峰, 通过吸光值下降速率即可表征谷胱甘肽过氧化物酶 4 的活性。

二、产品内容

名称		试剂规格	储存条件	使用说明及注意事项
提取液	组分 A	液体 70 mL×1 瓶	4°C 保存	按照组分 A: 组分 B=99:1 的体积比配制 (根据使用量现用现配)
	组分 B	液体 600 μ L×1 支	-20°C 保存	
试剂一		液体 24 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二		液体 320 μ L×1 支	-20°C 保存	按照试剂一: 试剂二=7:1 的体积比配制 (即为试剂二应用液, 根据使用量现用现配)
试剂三		液体 320 μ L×1 支	4°C 保存	按照试剂一: 试剂三=7:1 的体积比配制 (即为试剂三应用液, 根据使用量现用现配)
试剂四		粉剂×1 支	4°C 保存	使用前加入 163 μ L 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存 1 个月, 避免反复冻融)
试剂五		液体 230 μ L×1 支	4°C 保存	-
试剂六		粉剂×1 支	-20°C 保存	使用前加入 531 μ L 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存 1 个月, 避免反复冻融)
试剂七		液体 30 μ L×1 支	4°C 保存	按照试剂一: 试剂七=79:1 的体积比配制 (即为试剂七应用液, 根据使用量现用现配)

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：酶标仪、96孔UV板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

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0.1g组织，加入1mL提取液）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 10000g离心10min，取上清液置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为（500-1000）：1的比例（建议500万细菌或细胞加入1mL提取液）处理样品，冰浴超声破碎（功率200W，超声3s，间隔7s，总时间3min），4℃ 10000g离心10min，取上清液置于冰上待测。

③血清（浆）、培养液等液体样本：直接检测或适当稀释后再进行检测。注：若液体样本浑浊，建议4℃ 10000g离心10min，取上清液置于冰上待测。

2.测定步骤

①酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm。

②检测工作液的制备（现配现用）：使用前根据使用量按照试剂一：试剂四：试剂五：试剂六=143:1:2:4的体积比配制。

③试验前试剂二应用液、试剂三应用液、试剂七应用液和检测工作液置于25℃预热10min以上。

④在96孔UV板中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	对照组 (μL)
粗酶液	10	10
试剂二应用液	-	40
试剂三应用液	40	-
充分混匀，37℃准确反应60min		
检测工作液	130	130
试剂七应用液	20	20

吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定10s（总时间）时340nm处吸光值，记为A1测定和A1对照；②25℃准确反应300s，测定310s（总时间）时340nm处吸光值，记为A2测定和A2对照；③计算 ΔA 测定=A1测定-A2测定， ΔA 对照=A1对照-A2对照， $\Delta A = \Delta A$ 测定- ΔA 对照。注：每个样品均需设一个对照组。

3.谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 活性

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol NADPH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{GPX4 (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times \text{Cpr} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{1071.81 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每分钟消耗 1 nmol NADPH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{GPX4 (U/g)} = \frac{\Delta A \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}}}{\epsilon \times d \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{1071.81 \times \Delta A}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol NADPH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{GPX4 (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}}}{\epsilon \times d \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{1071.81 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟消耗 1 nmol NADPH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{GPX4 (U/mL)} = \frac{\Delta A \times 10^9 \times V_{\text{反总}}}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times T} = 1071.81 \times \Delta A$$

注释： V 反总：反应体系总体积， 2.0×10^{-4} L；V 样：提取过程中加入提取液体积，0.01 mL；V 提：提取过程中加入提取液体积，1 mL； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；d：96 孔 UV 板光径，0.6 cm；细菌或细胞数量：以万计，若 500 万细菌或细胞则代入 500 即可；Cpr：粗酶液蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；T：酶促反应时间，5 min； 10^9 ：单位换算系数， $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

四、注意事项

①准确在规定时间点完成吸光值测定，以确保检测结果的准确性和重复性；若同时测定多个样本时，应使用多道移液器且分批进行测定，以确保组间反应时间一致；

②粗酶液应置于冰上待测，建议提取完成后当天完成活性检测；

③若吸光值超过 3，建议检查 96 孔板是否为 96 孔 UV 板，96 孔板会因材质问题造成吸光值超出设备量程；

④为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

