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

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

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=2.86***mL***：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。

$$GSH + R\text{-}OOH \xrightarrow{\text{Glutathione Peroxidasee 4}} GSSG + R\text{-}OH + H_2O$$

$$NADPH\ (340nm) + H^+ + GSSG \xrightarrow{Glutathione\ Reductase} NADP^+ + 2GSH$$

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（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℃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***60min***，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。

   GPX4活性（U/mg prot）= [ΔA÷（ε×d）×10^9×V反] ÷（Cpr×V样）÷T×F =643.09×ΔA÷Cpr×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。

   GPX4活性（U/g 质量）= [ΔA÷（ε×d）×10^9×V反] ÷（W×V样÷V提）÷T×F =643.09×ΔA÷W×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。

GPX4活性（U/10^6 cell）= [ΔA÷（ε×d）×10^9×V反]÷（N×V样÷V提）÷T×F =643.09×ΔA÷N×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。

GPX4活性（U/mL）= [ΔA÷（ε×d）×10^9×V反] ÷V样÷T×F =643.09×ΔA×F

ε：NADPH摩尔消光系数，6.22×10^3L/(mol·cm)；d：1mL石英比色皿光径，1cm；10^9：换算系数，1mol=10^9nmol；V反：反应体系体积，1×10^{-3}L；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，ΔA=ΔA 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×ΔA÷Cpr×F=74.02 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，ΔA=ΔA 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×ΔA÷Cpr×F=20.74 U/mg prot