

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K883-M

产品规格: 48T(24 samples)/96T(48 samples)

检测仪器: 酶标仪(340 nm)

Elabscience®谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)

比色法测试盒

Glutathione Peroxidase 4 (GPX4) Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测动物组织及细胞样本中的谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX 4)的活力。

检测原理

谷胱甘肽过氧化物酶4(Glutathione peroxidase 4, GPX4)是一种含硒化半胱氨酸的谷胱甘肽过氧化物酶, 可将磷脂氢过氧化物还原为磷脂醇, 从而保护细胞膜免受氧化损伤。

本试剂盒测定原理: GPX4 催化底物生成的产物消耗还原剂。还原剂在340 nm 处有最大吸光度, 向体系中加入 GPX4 抑制剂, 通过测定非特异性酶活和总酶活, 计算 GPX4 特异性酶活。

本试剂盒检测组织或细胞样本时, 需测定总蛋白浓度, 推荐使用 BCA 法。(货号: E-BC-K318-M)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	25 mL×1 瓶	50 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	0.25 mL×1 支	0.5 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	氧化剂 (Oxidant)	0.15 mL×1 支	0.3 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	抑制剂 (Inhibitor)	0.25 mL×1 支	0.5 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	还原剂 (Reducing Reagent)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	促进剂 (Accelerant)	4 mL×1 瓶	8 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂八 (Reagent 8)	稳定剂 (Stabilizer)	0.5 mL×1 支	1 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
	96 孔紫外酶标板	96 孔×1 块		无要求

	96孔覆膜	2张	
	样本位置标记表	1张	

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(340 nm)、37°C 恒温箱

试剂：双蒸水，生理盐水(0.9%NaCl)

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温（25°C）。

② 提取工作液的配制：

将试剂八：生理盐水按体积比=1:89配制，置于冰上避光待用，现配现用，配好的提取工作液4 h内使用有效。

③ 试剂五工作液的配制：

将试剂一：试剂五按体积比=3:1配制，置于冰上避光待用现配现用，按需配制，一天内使用有效。

其余工作液可在第一步反应孵育期间配制。

④ 试剂二工作液配制：

取一支试剂二加入250 μL双蒸水，溶解混匀，未使用完的试剂可在-20°C保存2天。

⑤ 试剂六工作液配制：

取一支试剂六加入500 μL双蒸水，溶解混匀，未使用完的试剂可在-20°C保存2天。

⑥ 反应工作液的配制：

将试剂一：试剂二工作液：试剂三：试剂六工作液：试剂七=108:2:5:5:80配制，置于冰上避光待用，现配现用，按需配制，2 h内使用有效。

⑦ 试剂四工作液的配制：

将试剂一：试剂四按体积比=19:1配制，置于冰上避光待用，现配现用，按需配制，2 h内使用有效。

样本准备

① 样本处理

组织样本：按照组织样本质量(mg)：提取工作液体积(μL)=1:9的比例匀浆(如50 mg组织样本，加入450 μL 提取工作液)。4°C，10000 × g离心10 min，取上清待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

细胞样本：按照约 1×10^6 个细胞：提取工作液体积(μL)=1:200比例匀浆(如 1×10^6 个细胞，加入200 μL 提取工作液)。4°C，10000 × g离心10 min，取上清待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

制备好的样本上清可在2-8°C保存，当天使用有效。

进行GPX 4活性测定的样本，其蛋白浓度应大于0.2 gprot/L，否则会影响实验结果的准确性。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：3.22-44.69 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%小鼠肝组织	5-50	2.05×10^6 个 293T 细胞	不稀释
10%小鼠肾组织	2-6	1.9×10^6 个 4T1 细胞	不稀释
10%小鼠肺组织	2-5	2.03×10^6 个 Jurkat 细胞	不稀释
2×10^6 个 Molt-4 细胞	不稀释		

注：稀释液为提取工作液。

实验关键点

- ① 需要选取新鲜样本进行实验。
- ② 样本反应速率较快，如果没有及时测定 A_1 ，可能会导致样本测定值低或测不出值。
- ③ 加入试剂四工作液后 15 s 立即在酶标仪上进行测定，一次检测最多不超过 10 个孔。
- ④ 进行 GPX 4 活性测定的样本，其蛋白浓度应大于 0.2 gprot/L，否则会影影响实验结果的准确性。

操作步骤

- ① 测定孔/对照孔：取 20 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。
- ② 向步骤①中测定孔加入 40 μL 试剂一，对照孔加入 40 μL 试剂五工作液。
- ③ 振板 5 s，37°C 孵育 30 min。
- ④ 向步骤③中各孔加入 140 μL 反应工作液。
- ⑤ 向步骤④中各孔加入 40 μL 试剂四工作液。
- ⑥ 加入试剂四工作液后 15 s 立即在酶标仪 340 nm 波长下检测各孔 OD 值 A_1 。组织样本室温(25°C)孵育 5 min 后测定各孔 OD 值 A_2 。细胞样本室温(25°C)孵育 15 min 后测定各孔 OD 值 A_2 。样本反应速率较快，如果没有及时测定 A_1 ，可能会导致样本测定值低或测不出值。

操作表

	测定孔	对照孔
待测样本(μL)	20	20
试剂一(μL)	40	--
试剂五工作液(μL)	--	40
振板 5 s, 37°C 孵育 30 min。		
反应工作液(μL)	140	140
试剂四工作液(μL)	40	40
加入试剂四工作液后 15 s 立即在酶标仪 340 nm 波长下检测各孔 OD 值 A_1 。组织样本室温(25°C)孵育 5 min 后测定各孔 OD 值 A_2 。细胞样本室温(25°C)孵育 15 min 后测定各孔 OD 值 A_2 。样本反应速率较快, 如果没有及时测定 A_1 , 可能会导致样本测定值低或测不出值。		

本试剂盒检测组织或细胞样本时, 需测定总蛋白浓度, 推荐使用 BCA 法。(货号: E-BC-K318-M)。

结果计算

组织或细胞样本中谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)活力计算公式:

定义: 25°C 条件下, 每克蛋白每分钟催化底物产生 1 μmol 的产物所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{GPX4 活力 (U/gprot)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{对照}}) \div (\epsilon \times d) \times (V_{\text{总}} \div V_{\text{样}}) \div T \times f \div C_{\text{pr}}$$

注解:

$\Delta A_{\text{测定}}$: 测定孔样本的变化 OD 值($\Delta A_{\text{测定}} = A_{1\text{测定}} - A_{2\text{测定}}$)

$\Delta A_{\text{对照}}$: 对照孔样本的变化 OD 值($\Delta A_{\text{对照}} = A_{1\text{对照}} - A_{2\text{对照}}$)

ϵ : 显色产物在 340 nm 处的摩尔消光系数, $6.22 \times 10^{-3} \text{ L}/\mu\text{mol}/\text{cm}$

d : 96 孔板内反应体系光径, 0.60 cm

$V_{\text{总}}$: 反应的总体积, $240 \mu\text{L} = 0.24 \text{ mL}$

$V_{\text{样}}$: 加入反应体系中样本上清液的体积, $20 \mu\text{L} = 0.02 \text{ mL}$

C_{pr} : 加入检测体系前样本的蛋白浓度, gprot/L

f : 样本加入检测体系前的稀释倍数

T : 组织样本反应时间, 5 min; 细胞样本反应时间, 15 min

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	3.22-44.69 U/L	批间差	0.4-3.4 %
灵敏度	3.22 U/L	批内差	1.2-3.1 %
回收率	96.3-100 %		

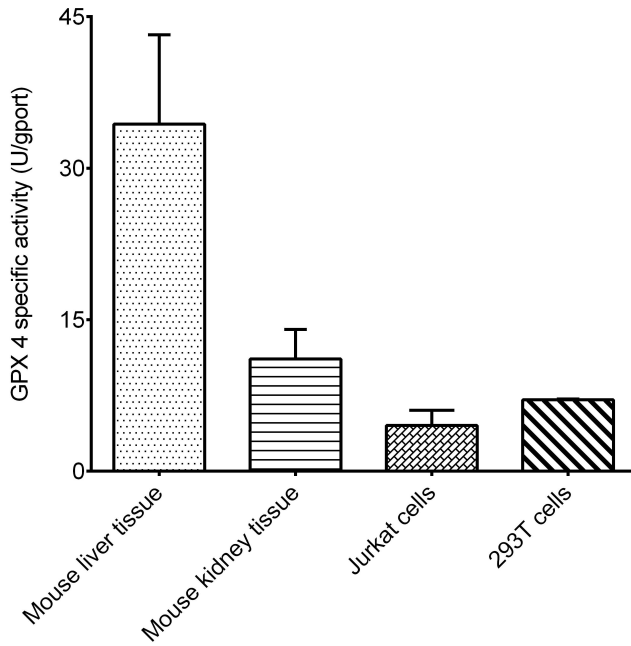
附录2 实例分析

例如小鼠肝组织(数据仅供参考):

取稀释10倍的10%小鼠肝组织匀浆20 μL加入到酶标板孔中,按操作表操作,结果如下: $\Delta A_{\text{测定}}$ 值为0.143, $\Delta A_{\text{对照}}$ 值为0.100,测定出10%小鼠肝组织的蛋白含量为6.177 gprot/L,计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{GPX 4活力(U/gport)} &= (0.143 - 0.100) \div (6.22 \times 10^{-3} \times 0.6) \times (0.24 \div 0.02) \div 5 \times 10 \div 6.177 \\ &= 44.76 \text{ U/gport} \end{aligned}$$

按说明书操作,测定10%小鼠肝组织(蛋白浓度为6.177 gprot/L,加样量20 μL)、10%小鼠肾组织(蛋白浓度为5.492 gprot/L,加样量20 μL)、Jurkat细胞(2.7×10^6 个,蛋白含量为0.639 gprot/L,加样量20 μL)、293T细胞(2.03×10^6 个,蛋白含量为1.635 gprot/L,加样量20 μL)中的GPX 4活力(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本测不出值	样本蛋白浓度低于 0.2 gprot/L, 酶活过低	增加样本上样量或提高样本蛋白浓度
	样本放置时间过久, 酶活下降	重新取新鲜样本进行检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

