CheKine™ 谷胱甘肽过氧化物酶 4（GPX4）活性检测试剂盒（微量法）

货号: KTB1642　　规格: 48 T/24 S　96 T/48 S　　批号：见产品标签

	适用样本：动物组织、细胞、细菌、血清（浆）
	保质期：-20℃，保存 12 个月

01 背景与原理

谷胱甘肽过氧化物酶 4（GPX4, EC.1.11.1.12）是哺乳动物体内唯一能够利用 GSH 直接还原膜结合态脂质过氧化物，保护脂质双分子层免受氧化破坏的一种单体含硒抗氧化酶。GPX4 以硒代半胱氨酸作为活性中心，参与细胞膜抗氧化、抑制铁死亡、精子成熟等重要生理功能。

本试剂盒检测原理是谷胱甘肽过氧化物酶（GPX）催化过氧化物氧化 GSH 产生 GSSG，谷胱甘肽还原酶（GR）催化 NADPH 还原 GSSG 再生成 GSH，同时 NADPH 被氧化成 $NADP^+$，测定 NADPH 在 340 nm 处吸光度值的减少速率即可计算样本中 GPX 的活性。通过在反应体系中加入 GPX4 抑制剂，可测定总 GPX 酶活力以及 GPX4 之外的非特异酶活力，两者之间的差值即为 GPX4 酶活力。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Extraction Buffer Ⅰ	30 mL	60 mL	-20℃
Extraction Buffer Ⅱ	0.3 mL	0.6 mL	-20℃
Reagent Ⅰ	15 mL	30 mL	-20℃
Reagent Ⅱ	0.75 mL	1.5 mL	-20℃
Reagent Ⅲ	0.75 mL	1.5 mL	-20℃
Reagent Ⅳ	50 μL	100 μL	-20℃
Reagent Ⅴ	0.15 mL	0.3 mL	-20℃
Reagent Ⅵ	0.6 mL	1.2 mL	-20℃
Reagent Ⅶ	0.6 mL	1.2 mL	-20℃

***请在实验前检查各组分的量。**

***各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行预实验。**

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 340 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	UV 板
试剂	PBS/生理盐水	样本清洗用
其他	匀浆器（组织样本）、恒温箱、冰盒、低温离心机、可调节式移液枪及枪头	样本匀浆操作全程冰上/低温

04 注意事项

- **正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。**
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，**请在实验全程做好生物安全防护**，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Extraction Buffer Ⅰ	即用型；使用前平衡到室温	-20℃保存
Extraction Buffer Ⅱ	即用型；使用前平衡到室温	-20℃保存
Working Extraction Buffer	临用前配制；每 1 mL 的 Extraction Buffer Ⅰ中加入 10 μL 的 Extraction Buffer Ⅱ	配制后当天使用有效
Reagent Ⅰ	即用型；使用前平衡到室温	-20℃保存
Reagent Ⅱ	即用型；使用前平衡到室温	-20℃保存
Reagent Ⅲ	即用型；使用前平衡到室温	-20℃保存
Reagent Ⅳ	即用型；使用前平衡到室温	-20℃保存
Working Reagent Ⅴ	临用前配制；每 0.9 mL 的 Reagent Ⅰ中加入 0.1 mL 的 Reagent Ⅴ	检测前配制，4 小时内有效
Working Reagent Ⅵ	临用前配制；每 0.8 mL 的 Reagent Ⅰ中加入 0.2 mL 的 Reagent Ⅵ	检测前配制，4 小时内有效
Working Reagent Ⅶ	临用前配制；每 0.8 mL 的 Reagent Ⅰ中加入 0.2 mL 的 Reagent Ⅶ	检测前配制，4 小时内有效

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本，冻存样本检测酶活结果可能降低。样品处理等过程均需要在冰上进行，且须在当日测定酶活力。

- **动物组织**：用冷的 PBS 清洗组织，尽可能去除血液。吸干组织上的水分，称重。称取 0.1 g 组织样本，加入 0.5 mL 的 Working Extraction Buffer，快速冰上匀浆。匀浆后的样本，12000 g，4℃离心 10 min，取上清液置冰上待测。组织样本建议用 Working Extraction Buffer 稀释 20 倍后检测，肝脏样本建议稀释 40 倍后检测。
- **细胞（菌）样本**：收集 5×10^6 细胞（菌）到离心管内，加入 0.5 mL 的 Working Extraction Buffer，冰浴超声波破碎细胞（菌）5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），然后 12000 g，4℃离心 10 min，取上清液置冰上待测。
- **血清（浆）**：可直接测定。若样本需要稀释，可用 Working Extraction Buffer 进行适当稀释（保证 $A_{1\,测定}$ 大于 1.0 且$\Delta A_{\,测定}$小于 0.8)。

05-3 实验步骤

1. **酶标仪准备**：预热 30 min 以上，调节波长到 340 nm。
2. **Working Reagent 的配制**：临用前配制；按照 Reagent Ⅰ：Reagent Ⅱ：Reagent Ⅲ：Reagent Ⅳ=1600 μL：150 μL：150 μL：10 μL 的比例混合均匀（每 14 个反应孔的配制量）。
3. **检测体系配制**：在 96 孔 UV 板中按照如下方式操作

试剂	测定孔（μL）	对照孔（μL）
样本	10	10
Working Reagent Ⅶ	90	0
Working Reagent Ⅵ	0	90
混匀，室温（25℃）孵育 30 min		
Working Reagent	130	130
Working Reagent Ⅴ	20	20

注意：可在加入 Working Reagent 前（即室温孵育 30 min 后）将 Working Reagent 与 Working Reagent Ⅴ按照每个反应需要 130 μL 以及 20 μL 的比例预混，然后每个反应孔中加入 150 μL 混合后试剂。

4. **吸光度检测**：迅速混匀，立即测定在 340 nm 的吸光度值 $A_{1\,测定}$和 $A_{1\,对照}$以及在 25℃下反应 5 min 后的 $A_{2\,测定}$和 $A_{2\,对照}$。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧**二维码**或访问官网[https://www.abbkine.cn]>进入“**技术中心**”>查找“**在线计算器**”**工具**。

06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算$\Delta A_{对照}=A_{1\,对照}-A_{2\,对照}$，$\Delta A_{测定}=A_{1\,测定}-A_{2\,测定}$。

2. 样本 GPX4 酶活计算

- 按样本质量计算

酶活单位定义：在 25℃下，每 g 样品每分钟催化 1 nmol NADPH 氧化定义为 1 个酶活单位。

GPX4 (U/g)=$[(\Delta A_{测定}-\Delta A_{对照})\div(\varepsilon\times d)\times V_{反总}\times 10^9]\div(V_{样}\div V_{样总}\times W)\div T$=**$535.9\times(\Delta A_{测定}-\Delta A_{对照})\div W$**

- 按细胞或细菌数量计算:

酶活单位定义：在 25℃下，每 10^6 个细胞或细菌每分钟催化 1 nmol NADPH 氧化定义为 1 个酶活单位。

GPX4 ($U/10^6$)=$[(\Delta A_{测定}-\Delta A_{对照})\div(\varepsilon\times d)\times V_{反总}\times 10^9]\div(N\times V_{样}\div V_{样总})\div T$=**$535.9\times(\Delta A_{测定}-\Delta A_{对照})\div N$**

- 按液体体积计算

酶活单位定义：在 25℃下，每 mL 液体每分钟催化 1 nmol NADPH 氧化定义为 1 个酶活单位。

GPX4 (U/mL)=$[(\Delta A_{测定}-\Delta A_{对照})\div(\varepsilon\times d)\times V_{反总}\times 10^9]\div V_{样}\div T$=**$1071.8\times(\Delta A_{测定}-\Delta A_{对照})$**

- 按蛋白浓度计算

酶活单位定义：在 25℃下，每 mg 蛋白每分钟催化 1 nmol NADPH 氧化定义为 1 个酶活单位。

GPX4 (U/mg)=$[(\Delta A_{测定}-\Delta A_{对照})\div(\varepsilon\times d)\times V_{反总}\times 10^9]\div(Cpr\times V_{样})\div T$=**$1071.8\times(\Delta A_{测定}-\Delta A_{对照})\div Cpr$**

ε：NADPH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L/mol/cm；d：96 孔 UV 板光径，0.75 cm；$V_{反总}$：反应体系总体积，250 μL=2.5×10^{-4} L；10^9：1 mol=1×10^9 nmol；Cpr：上清液蛋白浓度（mg/mL）；W：样品质量，g；$V_{样}$：加入反应体系中上清液体积，10 μL=1×10^{-2} mL；$V_{样总}$：提取液体积，0.5 mL；T：反应时间，5 min；N：细胞或细菌数量，以 10^6 为单位（例如细胞数量为 5×10^6，N=5）。

07 结果展示

示例-1：取 0.121 g 小鼠肾脏，匀浆上清稀释 20 倍后，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得$\Delta A_{测定}=A_{1\,测定}-A_{2\,测定}=1.433-0.825=0.608$，$\Delta A_{对照}=A_{1\,对照}-A_{2\,对照}=1.457-0.912=0.545$。按样本质量计算稀释 20 倍后的小鼠肾脏匀浆样本酶活为：GPX4 (U/g)=$535.9\times(\Delta A_{测定}-\Delta A_{对照})\div W=279.02$ U/g。

08 FAQ

- **此试剂盒检测的结果与 ELISA 产品检测的 GPX4 含量的结果有什么差异?**

此产品结果表示样本中 GPX4 酶的催化活性，与 ELISA 检测出的 GPX4 蛋白浓度结果表示的意义不同，可能会出现 GPX4 翻译后修饰导致蛋白浓度水平不变，但催化活性显著下降的现象。

- **检测得到的样本 GPX4 酶活过低或总 GPX 酶活过高怎么判断?**

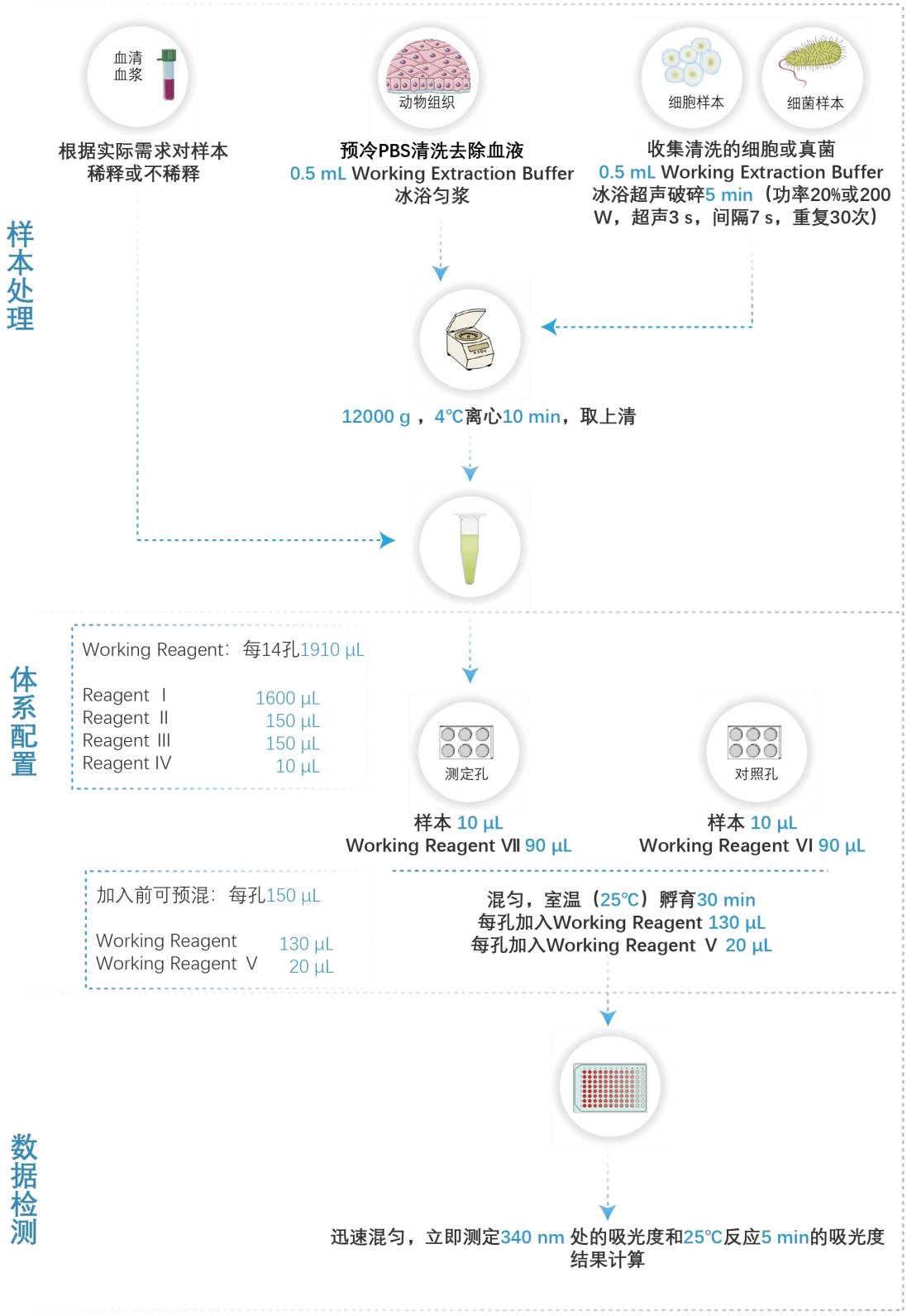
如果$\Delta A_{测定}-\Delta A_{对照}$小于 0.005，表明样本中 GPX4 酶活过低，可将 $A_{2\,测定}$和 $A_{2\,对照}$延长至 10 min 检测，并相应调整计算公式中的 T 为 10，或适当加大样本量后，再重新测定；如果 $A_{1\,测定}$小于 1.0 或$\Delta A_{测定}$大于 0.8，样本可用 Working Extraction Buffer 进一步稀释或减少提取用样本量，再重新测定。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1600	CheKine™ 还原型谷胱甘肽（GSH）含量检测试剂盒（微量法）
KTB1610	CheKine™ 氧化型谷胱甘肽（GSSG）含量检测试剂盒（微量法）
KTB1620	CheKine™ 谷胱甘肽还原酶（GR）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1630	CheKine™ 谷胱甘肽 S-转移酶（GST）活性检测试剂盒（微量法）

CheKine™ 谷胱甘肽过氧化物酶4（GPX4）活性检测流程示意图

（Abbkine 货号：KTB1642）



V1.0