

## 组织及血液氧化型谷胱甘肽（GSSG）含量检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AYHA4-C48	组织及血液氧化型谷胱甘肽（GSSG）试剂盒	48T	常量法

### 产品说明:

氧化型谷胱甘肽（GSSG）是谷胱甘肽（GSH）的氧化形式，又称为二硫代谷胱甘肽，是两分子的谷胱甘肽氧化而成。GSSG 会被谷胱甘肽还原酶还原成 GSH，因此机体中大多数是以还原型形式存在。测定细胞内 GSH 和 GSSG 含量以及 GSH/GSSG 比值，能够很好地反映细胞所处的氧化还原状态。本试剂盒利用谷胱甘肽能和 5,5' - 二硫代-双-(2-硝基苯甲酸) (5,5' -dithiobis-2-nitrobenoic acid, DTNB) 反应产生 2-硝基-5-巯基苯甲酸，2-硝基-5-巯基苯甲酸在波长 412nm 处具有最大光吸收的特点，通过 2-乙烯吡啶抑制样本中原有的还原型谷胱甘肽，然后利用谷胱甘肽还原酶将 GSSG 还原为 GSH，借此测定氧化型谷胱甘肽的含量。

### 试剂组成:

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 170 μL×1 支	2-8℃保存
试剂三	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 8 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	粉剂×1瓶	2-8℃保存
试剂六	液体 40 μL×1 支	2-8℃保存
标准品	粉剂×1支	2-8℃保存

### 操作步骤:

#### 一、样本处理

1. 组织: 按照组织质量 (g): 试剂一 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂一) 进行冰浴匀浆 (匀浆器/研钵提前放冰上预冷)。12000g, 4℃ 离心 10min, 取上清液放置于 4℃ 待测。若暂时不能完成测试可放于 -80℃ 保存 (可保存 3 天)。
2. 细菌、细胞: 按照细胞数量 (10<sup>6</sup> 个): 试剂一 体积 (mL) 为 5~10: 1 的比例 (建议 5 百万细胞加入 1mL 试剂一), 反复冻融 2-3 次 (可在液氮中冻结、37℃ 水浴中溶解) 或者冰浴超声波破碎细胞 (功率 200w, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次), 12000g 离心 10 分钟, 取上清液于冰上待测。若暂时不能完成测试可放于 -80℃ 保存 (可保存 3 天)。
3. 血液处理

血浆：将收集的抗凝血于4℃，600g 离心 10 分钟，吸取上层血浆到另一支试管中，加入等体积的**试剂一**，沸水浴5min（缠封口膜，防止爆盖）。之后 12000g 常温离心 10 分钟，将上清移入新的试管中放置于4℃待测，若暂时不能完成测试可放于-80℃保存（可保存3 天）。

血细胞：将收集的抗凝血于4℃，600g 离心 10 分钟，弃去上层血浆用3 倍体积的PBS 清洗3 次（用 PBS 重悬血细胞，600g 离心 10 分钟），加入等体积**试剂一**，沸水浴5min（缠封口膜，防止爆盖）。之后 12000g 常温离心 10 分钟，吸取上清放于4℃待测，若暂时不能完成测试可放于-80℃保存（可保存3 天）。

## 二、测定步骤

1. 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至412nm，蒸馏水调零。
2. 试剂三放置37℃水浴中保温 30min。
3. 标准品的稀释：吸取 10mg/mL 标准溶液，用蒸馏水稀释至 50μg/mL、25μg/mL、12.5μg/mL、6.25μg/mL、3.125μg/mL、1.5625μg/mL。
4. 标准品稀释表：

序号	稀释前浓度(μg/mL)	标准液体积(μL)	蒸馏水体积(μL)	稀释后浓度(μg/mL)
1	10000（即 10mg/mL）	100	900	1000
2	1000	50	950	50
3	50	500	500	25
4	25	500	500	12.5
5	12.5	500	500	6.25
6	6.25	500	500	3.125
7	3.125	500	500	1.5625

备注：下述实验中每个标准管需 100μL 标准品（注意不要在此步骤直接检测吸光度）。

### 5. 操作表：（在 1mL 玻璃比色皿内加入下列试剂）

试剂名称(μL)	测定管	标准管	空白管
样本	100	-	-

标准品	-	100	-
蒸馏水	-	-	100
试剂二	2	2	2
37℃孵育30 分钟后继续加入下列试剂			
试剂三	700	700	700
试剂四	100	100	100
试剂五	100	100	100
试剂六工作液	10	10	10

加入试剂六工作液的同时开始计时，迅速混匀，于412nm 处测定30s 和 150s 的吸光值，分别记为A1 测定、A1 标准、A1 空白和A2 测定、A2 标准、A2 空白，计算 $\Delta A$  测定=A2 测定 - A1 测定， $\Delta A$  标准=A2 标准 - A1 标准， $\Delta A$  空白=A2 空白 - A1 空白。空白管和标准曲线只需做 1-2 次。

**注：**如果样本量过多，可将试剂三与试剂六工作液按照比例混匀配成工作液，在最后一步加入，加入工作液 即开始计时。用多少配多少。

### 三、GSSG 含量计算

#### 1. 绘制标准曲线：

以标准管的浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ ) 为横坐标x，以 ( $\Delta A$  标准- $\Delta A$  空白) 为纵坐标y，绘制标准曲线。根据标准曲线，将 ( $\Delta A$  测定- $\Delta A$  空白) 带入公式计算样本浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )

2. 按蛋白浓度计算： $\text{GSSG 含量 } (\mu\text{g/mg prot}) = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) = x \div C_{\text{pr}}$
3. 按样本质量计算： $\text{GSSG 含量 } (\mu\text{g/g 质量}) = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) = x \div W$
4. 按细胞/细菌数量计算： $\text{GSSG 含量 } (\mu\text{g}/10^6 \text{ cell}) = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times N) = x \div N$
5. 按液体体积计算： $\text{GSSG 含量 } (\mu\text{g/mL}) = 2x$

$V_{\text{样总}}$ ：上清液总体积，1mL； $V_{\text{样}}$ ：加入反应体系中上清液体积，100 $\mu\text{L}$ =0.1mL； $W$ ：样本质量，g； $C_{\text{pr}}$ ：上清液蛋白质浓度，mg/mL； $N$ ：细胞/细菌数量，以  $10^6$  计；2：血浆（血细胞）稀释一倍。

#### 注意事项：

1. 若不确定样本中GSSG 含量的高低，可稀释几个梯度后再进行测量。
2. 如果测定吸光值超过线性范围吸光值，可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。
3. 因为试剂一中含有蛋白质沉淀剂，因此上清液不能用于蛋白浓度测定。如需测定蛋白含量，需另取组织。