

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-M96	组织及血液氧化型谷胱甘肽（GSSG）试剂盒	96T	微量法

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 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 130 μL×1 支	2-8℃保存
试剂三	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 2.5 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	粉剂×1瓶	2-8℃保存
试剂六	液体 12.5 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（10⁶ 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，取上清置于冰上待测。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/酶标仪预热30min以上，调节波长至412nm，分光光度计蒸馏水调零。

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125μg/mL、62.5μg/mL、31.25μg/mL、15.625μg/mL、7.8125μg/mL、3.90625μg/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	125	875	125
3	125	100	100	62.5
4	62.5	100	100	31.25
5	31.25	100	100	15.625
6	15.625	100	100	7.8125
7	7.8125	100	100	3.90625

备注：下述实验中每个标准管需20μL标准品（注意不要在此步骤直接检测吸光度）。

5. 操作表：（在微量玻璃比色皿/96孔板内加入下列试剂）

试剂名称 (μL)	测定管	标准管	空白管
样本	20	-	-
标准品	-	20	-
蒸馏水	-	-	20
试剂二	1	1	1
37℃ 孵育 30 分钟后, 继续加入下列试剂			
试剂三	140	140	140
试剂四	20	20	20
试剂五	20	20	20
试剂六工作液	2	2	2

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 ΔA 测定=A2 测定 - A1 测定, ΔA 标准=A2 标准 - A1 标准, ΔA 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(ΔA 标准- ΔA 空白) 为纵坐标y, 绘制标准曲线。根据标准曲线, 将(ΔA 测定- ΔA 空白) 带入公式计算样本浓度 ($\mu\text{g/mL}$)

2. GSSG 含量计算:

(1) 按蛋白浓度计算: $\text{GSSG 含量 } (\mu\text{g/mg prot}) = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) = x \div \text{Cpr}$

(2) 按样本质量计算: $\text{GSSG 含量 } (\mu\text{g/g 质量}) = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) = x \div W$

(3) 按细胞/细菌数量计算: $\text{GSSG 含量 } (\mu\text{g}/10^6 \text{ cell}) = x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times N) = x \div N$

(4) 按液体体积计算: $\text{GSSG 含量 } (\mu\text{g/mL}) = 2x$

V 样总: 上清液总体积, 1mL; V 样: 加入反应体系中上清液体积, $20\mu\text{L}=0.02\text{mL}$;
W: 样本质量, g; Cpr: 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。
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。