

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
PYHA4-C48	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-乙炔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

溶液的配制:

1. 试剂二：有毒易挥发试剂，涉及该试剂的步骤建议在通风橱内操作。
2. 试剂五：临用前加入 8 mL 蒸馏水，溶解后-20℃分装可保存4 周，避免反复冻融。
3. 试剂六工作液：先将试剂六内液体离心至底部再用移液枪吹打混匀使用。临用前根据样本数量按照试剂 六：蒸馏水=1μL：20μL（21μL，约 2T）的比例配制备用，现用现配。
4. 标准品：10mg 氧化型谷胱甘肽。临用前加入 1 mL 蒸馏水，充分溶解，浓度为 10 mg/mL，2-8℃可保存4 周。

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): **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 (10^6 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 50 μ g/mL、25 μ g/mL、12.5 μ g/mL、6.25 μ g/mL、3.125 μ g/mL、1.5625 μ g/mL。

序号	稀释前浓度 (μ g/mL)	标准液体积 (μ L)	蒸馏水体积 (μ L)	稀释后浓度 (μ g/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
---	-------	-----	-----	--------

4. 标准品稀释表:

备注: 下述实验中每个标准管需 100 μ L 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 (μ L)	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 $^{\circ}$ C 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 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 (μ 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 (μ g/mL)

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

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

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

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

V 样总：上清液总体积，1mL；V 样：加入反应体系中上清液体积，100 μ L=0.1mL；
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 10⁶ 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。