

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-M96	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

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 2.5 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 10T）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/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 125 μ g/mL、62.5 μ g/mL、31.25 μ g/mL、15.625 μ g/mL、7.8125 μ g/mL、3.90625 μ g/mL。
- 4、标准品稀释表：

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	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20 μ L 标准品（注意不要在此步骤直接检测吸光度）。

5. 操作表：（在微量玻璃比色皿/96 孔板内加入下列试剂）

试剂名称 (μ L)	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 $^{\circ}$ C 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 (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. GSSG 含量计算：

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

(2) 按样本质量计算：GSSG 含量 (μ 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: 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: GSSG 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, $20\mu\text{L}=0.02\text{mL}$;
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。