

氧化型谷胱甘肽（GSSG）含量检测试剂盒说明书

微量法

注意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

货号：BC1185

规格：100T/96S

产品内容：

试剂一：液体 100ml×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 130μl×1 支，4℃ 保存。

试剂三：液体 20ml×1 瓶，4℃ 保存。

试剂四：液体 2.5ml×1 瓶，4℃ 保存。

试剂五：粉剂 1 瓶，4℃ 保存，用前 2.5ml 蒸馏水溶解。溶解后-20℃ 分装保存。

试剂六：液体 12.5μl×1 支，用前 0.25ml 蒸馏水稀释。

标准品：粉剂 10mg×1 支，4℃ 避光保存。

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-乙烯吡啶抑制样品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。

自备仪器和用品：

分析天平、微量匀浆器（规格 2ml）、低温离心机、水浴锅、移液器、可见分光光度计或酶标仪、微量玻璃 比色皿或 96 孔板。

操作步骤：

一、样品的处理

（1）组织处理

新鲜组织首先用 PBS 冲洗 2 次，然后称取动物组织或者植物组织 0.1g。加入用试剂一润洗过的匀浆器中（匀浆器提前放冰上预冷）；然后加入 1ml 试剂一（组织/试剂一比例保持不变即可），迅速冰上充分研磨（使用液氮研磨效果更好）；10000rpm 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 10 天）。

（2）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，加入等体积的试剂一，4℃，8000g 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 10 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，混匀后 4℃放置 10 分钟，8000g 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 10 天）。

（3）细胞处理

收集不少于 10⁶ 个细胞，首先用 PBS 清洗细胞 2 次（PBS 重悬细胞，600g 离心 10 分钟），加入 3 倍细胞沉淀体积的试剂一重悬细胞，反复冻融 2-3 次（可在液氮中冻结，37℃水浴中溶解），8000g 离心 10 分钟，收集上清于 4℃待测，若暂时不能完成测试可放于-80℃保存（可保存 10 天）。

二、实验操作：

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 412nm，分光光度计蒸馏水调零。

2、试剂二放置 37℃（哺乳动物）或 25℃（一般物种）水浴中保温 30min。

3、标准品的稀释：将标准品用 1ml 蒸馏水溶解(4℃保存)，浓度为 10mg/ml。取适当溶液配制浓度为 25μg/ml、20μg/ml、12.5μg/ml、6.25μg/ml、3.125μg/ml、0μg/ml 的标准品（试剂一十倍稀释后进行稀释）。

4、取 0.5ml 离心管，加入 20μL 稀释好的标准品或样品，加入 1μL 试剂二，混匀后 37℃孵育 30 分钟。

5、制作标准曲线

孵育完成后标准管依次加入 140μL 试剂三，20 μL 试剂四，20 μL 试剂五，2 μL 试剂六，迅速混匀后，测定 412nm 处 30 s 和 150 s 光吸收 A1 和 A2。吸光度（A2-A1）为横坐标（x），浓度为纵坐标（y）做标准曲线。

6、样品管依次加入 140μL 试剂三，20 μL 试剂四，20 μL 试剂五，2 μL 试剂六，迅速混匀后，测定 412nm 处 30 s 和 150 s 光吸收 A1 和 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。

三、GSSG 含量计算

根据标准曲线，将样品 ΔA 带入公式中（x），计算出样品浓度 y（μg/ml）。

（1）按蛋白浓度计算

$$\text{GSSG} (\mu\text{g} / \text{mg prot}) = y \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div \text{Cpr} = y \div \text{Cpr}$$

（2）按样本质量计算

$$\text{GSSG} (\mu\text{g} / \text{g}) = y \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) = y \div W$$

（3）按细胞数量计算

$$\text{GSSG} (\mu\text{g} / 10^4 \text{ cell}) = y \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) = y \div \text{细胞数量}$$

（4）按液体体积计算

$$\text{GSSG} (\mu\text{g} / \text{mL}) = 2y$$

V 样总：上清液总体积，1 mL；V 样：加入反应体系中上清液体积，20μL=0.02 mL；W：样品质量，g；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；细胞数量，以 10⁶ 单位计量；2：血浆（血细胞）稀释一倍。

注意事项：

1、样品处理需匀浆完全，若当天不能完成测量，可放-80℃保存。

2、若不确定样品中 GSSG 含量的高低，可稀释几个梯度后再进行测量。

3、此方法利用酶促反应速率计算底物浓度，尽量准确在 30 秒和 150 秒处完成读数。

4、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。