

## 氧化型谷胱甘肽（GSSG）含量检测试剂盒说明书

微量法

**注意：**本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC1185

规格：100T/96S

**产品组成：**使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

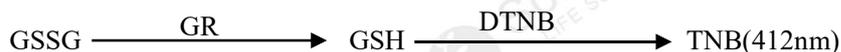
试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 110 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 130 μL×1 支	2-8°C保存
试剂三	液体 20 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂四	液体 2.5 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂五	粉剂×1 瓶	2-8°C保存
试剂六	液体 12.5 μL×1 支	2-8°C保存
标准品	粉剂×1 支	2-8°C保存

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°C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°C可保存 4 周。

**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。



**技术指标：**

最低检出限：3.211 μg/mL

线性范围：3.9-125 μg/mL

**注意：**实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。





## 需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、分析天平、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、匀浆器/研钵/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

## 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<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，4℃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，4℃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，4℃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 标准品，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）	标准品体积（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°C 孵育 30 分钟后，继续加入下列试剂，此步骤需要在 EP 管中进行反应，禁止使用 96 孔板反应			
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 $\Delta A$ 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。			
<b>注：</b> 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. GSSG 含量计算：

- (1) 按蛋白浓度计算：GSSG 含量 ( $\mu\text{g/mg prot}$ ) =  $x \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) = x \div C_{\text{pr}}$
- (2) 按样本质量计算：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：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 ( $\mu\text{g/mL}$ ) =  $2x$

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

#### 实验实例：

1. 取 0.1064g 大鼠肝脏加入 1mL 试剂一进行冰浴匀浆，按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算  $\Delta A$  测定 = A2 测定 - A1 测定 = 0.240 - 0.149 = 0.091， $\Delta A$  空白 = A2 空白 - A1 空白 = 0.118 - 0.114 = 0.004， $\Delta A$  测定 -  $\Delta A$  空白 = 0.087，根据标准曲线  $y = 0.0117x - 0.0122$ ， $R^2 = 0.9989$ ， $x = 8.479$ ，按样本质量计算得：  
GSSG 含量 ( $\mu\text{g/g 质量}$ ) =  $x \div W = 79.690 \mu\text{g/g 质量}$ 。





2. 取0.1050g韭菜叶片加入1mL试剂一进行冰浴匀浆,按照测定步骤操作,用96孔板测得计算 $\Delta A_{测定} = A_2_{测定} - A_1_{测定} = 0.198 - 0.150 = 0.048$ ,  $\Delta A_{空白} = A_2_{空白} - A_1_{空白} = 0.118 - 0.114 = 0.004$ ,  $\Delta A_{测定} - \Delta A_{空白} = 0.044$ , 根据标准曲线 $y = 0.0117x - 0.0122$ ,  $R^2 = 0.9989$ ,  $x = 4.803$ , 按样本质量计算得:

GSSG含量 ( $\mu\text{g/g}$  质量)  $= x \div W = 45.74 \mu\text{g/g}$  质量。

#### 相关发表文献:

[1] Xiao S, Song W, Xing J, Su A, Zhao Y, Li C, Shi Z, Li Z, Wang S, Zhang R, Pei Y, Chen H, Zhao J. ORF355 confers enhanced salinity stress adaptability to S-type cytoplasmic male sterility maize by modulating the mitochondrial metabolic homeostasis. *J Integr Plant Biol.* 2023 Mar;65(3):656-673. doi: 10.1111/jipb.13382. Epub 2023 Jan 3.

[2] Shen WY, Jia CP, Liao LY, Chen LL, Hou C, Liu YH, Liang H, Chen ZF. Copper (II) Complexes of Halogenated Quinoline Schiff Base Derivatives Enabled Cancer Therapy through Glutathione-Assisted Chemodynamic Therapy and Inhibition of Autophagy Flux. *J Med Chem.* 2022 Mar 24;65(6):5134-5148. doi: 10.1021/acs.jmedchem.2c00133.

#### 参考文献:

[1] Alpert A J, Gilbert H F. Detection of oxidized and reduced glutathione with a recycling postcolumn reaction[J]. *Analytical biochemistry*, 1985, 144(2): 553-562.

[2] Owens C W I, Belcher R V. A colorimetric micro-method for the determination of glutathione[J]. *Biochemical Journal*, 1965, 94(3): 705.

#### 相关系列产品:

BC1170/ BC1175 还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量检测试剂盒

BC1190/ BC1195 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px/GPX) 活性检测试剂盒

BC0350/ BC0355 谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 活性检测试剂盒

BC1160/ BC1165 谷胱甘肽还原酶 (GR) 活性检测试剂盒

