

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0330

Size: 100T/96S

氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

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。

二、测定原理:

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。

三、需自备的仪器和用品:

分析天平、匀浆器/研钵、低温离心机、水浴锅、移液器、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 100mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	液体 130μL×1 支	4°C 保存	易挥发
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂四	液体 2.5mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂五	粉剂×1 瓶	4°C 保存	用前 2.5mL 蒸馏水溶解。溶解后-20°C分装保存
试剂六	液体 12.5μL×1 支	4°C 保存	用前 0.25mL 蒸馏水稀释
标准品	粉剂 10mg×1 支	4°C 保存	

五、操作步骤：

● 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）8000g 4°C离心 10min；取上清液放置于 4°C待测，若暂时不能完成测试可放于-80°C保存（可保存 10 天）

(2) 血液处理

血浆：将收集的抗凝血于 4°C，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°C，8000g 离心 10 分钟，将上清移入新的试管中放置于 4°C待测，若暂时不能完成测试可放于-80°C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 10^6 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）

● 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试剂三，20μL试剂四，20μL试剂五，2μL试剂六，迅速混匀后，测定412nm处30s和150s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试剂三，20μL试剂四，20μL试剂五，2μL试剂六，迅速混匀后，测定412nm处30s和150s光吸收A1和A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。

六、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 ($\mu\text{g/mL}$)。

(1) 按蛋白浓度计算

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

(2) 按样本质量计算

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

(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

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

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，20 μL =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 10^6 单位计量；2：血浆（血细胞）稀释一倍。

七、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°C 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。如需测定蛋白含量，需另取组织。