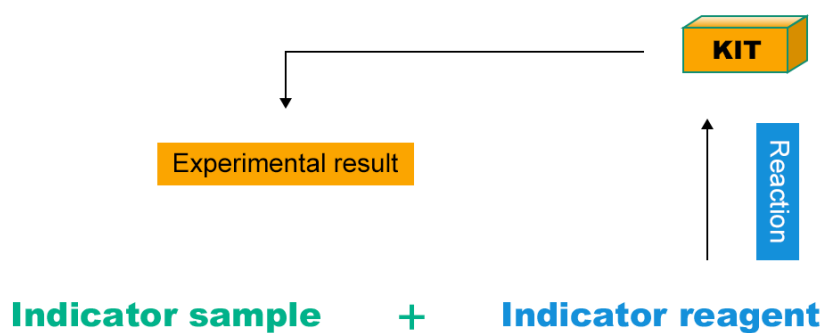


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0603

Size: 50T/48S

氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*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、1mL 玻璃比色皿。

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 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 170μL×1 支	4℃保存	易挥发
试剂三	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 8mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉剂×1 瓶	4℃保存	用前 8mL 蒸馏水溶解。溶解后-20℃分装保存
试剂六	液体 40μL×1 支	4℃保存	用前 0.8mL 蒸馏水稀释
标准品	粉剂 10mg×1 支	4℃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℃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 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°C 水浴中溶解), 8000g 离心 10 分钟, 收集上清于 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)。

● 实验操作:

- 1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 412nm, 蒸馏水调零。
- 2、试剂二放置 37°C (哺乳动物) 或 25°C (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°C 保存), 浓度为 10mg/mL。取适当溶液配制浓度为 25 μ g/mL、20 μ g/mL、12.5 μ g/mL、6.25 μ g/mL、3.125 μ g/mL、0 μ g/mL 的标准品 (试剂一十倍稀释后进行稀释)。
- 4、取 1.5mL 离心管, 加入 100 μ L 稀释好的标准品或样品, 加入 2 μ L 试剂二, 混匀后 37°C 孵育 30 分钟。
- 5、制作标准曲线

孵育完成后标准管依次加入 700 μ L 试剂三, 100 μ L 试剂四, 100 μ L 试剂五, 10 μ L 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 700 μ L 试剂三, 100 μ L 试剂四, 100 μ L 试剂五, 10 μ L 试剂六, 迅速混匀后, 测定 412nm 处 30 s 和 150 s 光吸收 A1 和 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。

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 (μ 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，100 μ L=0.1 mL；W：样品质量，g；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；细胞数量，以 10⁶ 为单位计量；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℃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。