

上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

氧化型谷胱甘肽含量测定试剂盒说明书

微量法

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

GSH/GSSG是细胞内最重要的氧化还原对之一。因此，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，也是谷胱甘肽氧化还原循环的主要指标之一。

测定原理：

利用2-VP法测GSSG含量。

自备仪器和用品：

低温离心机、水浴锅、可调节移液器、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96孔板、和蒸馏水。

试剂组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	液体×1 支	4℃保存	-
试剂三	液体×1 瓶	4℃保存	-
试剂四	液体×1 瓶	4℃保存	临用前加入5mL蒸馏水溶解，4℃保存
试剂五	液体×1 瓶	-20℃保存	临用前加入0.2mL蒸馏水稀释，4℃保存
标准液	液体×1 瓶	4℃保存	1 μmol/mL GSSG

粗酶液提取：

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。8000g 4℃离心10min，取上清液（如上清不清澈，再离心3min）100 μL，加900 μL的蒸馏水混匀待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量（10⁴个）：试剂一体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细胞加入1mL试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率300w，超声3秒，间隔7秒，总时间3min）；8000g 4℃离心10min，取上清液（如上清不清澈，再离心3min）100 μL，加900 μL的蒸馏水混匀待测。
3. 血清等液体：直接测定。

GSSG 含量测定：

1. 分光光度计/酶标仪预热30min，调节波长到412nm，蒸馏水调零。
2. 试剂三置于25℃（一般物种）或者37℃（哺乳动物）水浴中保温30min。
3. 标准管：取0.5mL EP管，加入20 μL标准液，1 μL试剂二，盖紧后混匀，置于37℃水浴30min；开盖后依次加入140 μL试剂三，40 μL试剂四，2 μL试剂五，迅速混匀后，测定30s和150s光吸收A1和A2。

4. 测定管：取0.5mL EP管，加入20 μL上清液，1 μL试剂二，盖紧后混匀，置于37°C水浴30min；开盖后依次加入140 μL试剂三，40 μL试剂四，2 μL试剂五，迅速混匀后，测定30s和150s光吸收A3和A4。
注意：标准管只需要测定一次。

GSSG 含量计算公式：

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按蛋白浓度计算

$$\text{GSSG } (\mu\text{mol/mg prot}) = C \text{ 标准液} \times (A4 - A3) \div (A2 - A1) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times C_{pr})$$

$$= 30.45 \times (A4 - A3) \div (A2 - A1) \div C_{pr}$$

(2) 按样本质量计算

$$\text{GSSG } (\mu\text{mol/g}) = C \text{ 标准液} \times (A4 - A3) \div (A2 - A1) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W)$$

$$= 30.45 \times (A4 - A3) \div (A2 - A1) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

$$\text{GSSG } (\mu\text{mol}/10^4\text{cell}) = C \text{ 标准液} \times (A4 - A3) \div (A2 - A1) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times \text{细胞数量} = 30.45$$

$$\times (A4 - A3) \div (A2 - A1) \div \text{细胞数量}$$

(4) 按照液体体积计算

$$\text{GSSG } (\mu\text{mol/mL}) = C \text{ 标准液} \times (A4 - A3) \div (A2 - A1) \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样}$$

$$= 30.45 \times (A4 - A3) \div (A2 - A1)$$

C 标准液：3 μmol/mL GSSG；W：样品质量，g；C_{pr}：上清液蛋白质浓度，mg/mL；V 反总：反应总体积，0.203mL；V 样：反应中加入样本体积，0.02mL；V 样总：加入提取液体积，1mL

b. 使用96孔板测定的计算公式如下

(1) 按蛋白浓度计算

$$\text{GSSG } (\mu\text{mol/mg prot}) = C \text{ 标准液} \times (A4 - A3) \div (A2 - A1) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times C_{pr})$$

$$= 30.45 \times (A4 - A3) \div (A2 - A1) \div C_{pr}$$

(2) 按样本质量计算

$$\text{GSSG } (\mu\text{mol/g}) = C \text{ 标准液} \times (A4 - A3) \div (A2 - A1) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W)$$

$$= 30.45 \times (A4 - A3) \div (A2 - A1) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

$$\text{GSSG } (\mu\text{mol}/10^4\text{cell}) = C \text{ 标准液} \times (A4 - A3) \div (A2 - A1) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times \text{细胞数量} = 30.45$$

$$\times (A4 - A3) \div (A2 - A1) \div \text{细胞数量}$$

(4) 按照液体体积计算

$$\text{GSSG } (\mu\text{mol/mL}) = C \text{ 标准液} \times (A4 - A3) \div (A2 - A1) \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样}$$

$$= 30.45 \times (A4 - A3) \div (A2 - A1)$$

C 标准液：3 μmol/mL GSSG；W：样品质量，g；C_{pr}：上清液蛋白质浓度，mg/mL，V 反总：反应总体积，0.203mL；V 样：反应中加入样本体积，0.02mL；V 样总：加入提取液体积，1mL

注意事项：

1. 提取过程中去掉蛋白质，所以提取液不能用于测定蛋白含量。
2. 临用前配制的试剂配好后 4°C保存，3天内使用完毕。
3. 最低检出限为1mmol/L。