

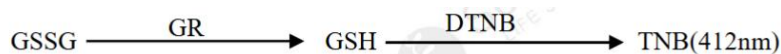
氧化型谷胱甘肽（GSSG）含量检测试剂盒（可见分光光度法）

产品货号：BA1463

产品规格：50管/48样

产品简介：

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-nitrobenzoic 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：3.211μg/mL

线性范围：3.9-125μg/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。

试剂盒组分与配制：

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

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2.5mL蒸馏水，溶解后-20℃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1mL蒸馏水，充分溶解，浓度为10mg/mL，2-8℃可保存4周。

所需仪器和用品：

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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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（10⁶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℃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			



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

测定、A1标准、A1空白和A2测定、A2标准、A2空白，计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A2_{\text{测定}} - A1_{\text{测定}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A2_{\text{标准}} - A1_{\text{标准}}$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A2_{\text{空白}} - A1_{\text{空白}}$ 。空白管和标准曲线只需做1-2次。

注：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（ $\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}$ ）为纵坐标y，绘制标准曲线。根据标准曲线，将（ $\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}$ ）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样总：上清液总体积，1mL；V样：加入反应体系中上清液体积，20 μL =0.02mL；W：样本质量，g；Cpr：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 $\Delta A_{\text{测定}} = A2_{\text{测定}} - A1_{\text{测定}} = 0.240 - 0.149 = 0.091$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A2_{\text{空白}} - A1_{\text{空白}} = 0.118 - 0.114 = 0.004$ ， $\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}} = 0.087$ ，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 $\Delta A_{\text{测定}} = A2_{\text{测定}} - A1_{\text{测定}} = 0.198 - 0.150 = 0.048$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A2_{\text{空白}} - A1_{\text{空白}} = 0.118 - 0.114 = 0.004$ ， $\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}} = 0.044$ ，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（ $\mu\text{g/g 质量}$ ）= $x \div W = 45.74 \mu\text{g/g 质量}$ 。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com