

氧化型谷胱甘肽（GSSG）含量检测试剂盒（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。

产品货号：BA1464

产品规格：100管/96样

产品内容：

试剂一：液体100ml×1瓶，4℃保存。

试剂二：液体130 μl×1支，4℃保存。

试剂三：液体20ml×1瓶，4℃保存。

试剂四：液体2.5ml×1瓶，4℃保存。

试剂五：粉剂1瓶，4℃保存，用前2.5ml蒸馏水溶解。溶解后-20℃分装保存。

试剂六：液体12.5 μl×1支，用前0.25ml蒸馏水稀释。

标准品：粉剂10mg×1支，4℃避光保存。

产品说明：

氧化型谷胱甘肽（GSSG）是谷胱甘肽（GSH）的氧化形式，又称为二巯代谷胱甘肽，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'-二巯代-双-(2-硝基苯甲酸) (5, 5'-dithiobis-2-nitrobenoic acid, DTNB) 反应产生2-硝基--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。

需自备的仪器和用品：

分析天平、微量匀浆器（规格2ml）、低温离心机、水浴锅、移液器、可见分光光度计或酶标仪、微量玻璃比色皿或96孔板。

操作步骤：

一、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）；10000rpm 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10⁶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



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

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）。

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

三、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（μg/ml）。

（1）按蛋白浓度计算

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

（2）按样本质量计算

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

（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

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

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，20μL=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10⁶单位计量；2：血浆（血细胞）稀释一倍。

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。
- 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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com