

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-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：1.369 μ g/mL

线性范围：1.5625-50 μ g/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。

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体50mL×1瓶	4℃
试剂二	液体170 μ L×1支	4℃
试剂三	液体60mL×1瓶	4℃
试剂四	液体8mL×1瓶	4℃
试剂五	粉剂×1瓶	4℃
试剂六	液体40 μ L×1瓶	4℃
标准品	粉剂10mg×1支	4℃

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8mL蒸馏水，溶解后-20℃分装保存；
3. 试剂六：液体置于试剂瓶内EP管中。临用前根据样本量将试剂六、蒸馏水按1:20（V:V）的比例配制备用，现用现配；
4. 标准品：用1mL蒸馏水溶解，浓度为10mg/mL，4℃保存。

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。

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）。



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

(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℃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、测定步骤

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℃（哺乳动物）或25℃（一般物种）水浴中保温30min。
3. 标准品的稀释：取适当溶液配制浓度为50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.5625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 μL 稀释好的标准品或样本，加入2 μL 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（0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为空白管）依次加入700 μL 试剂三，100 μL 试剂四，100 μL 试剂五，10 μL 试剂六（加入试剂六即开始计时），迅速混匀后，测定412nm处30s和150s光吸收A1和A2，计算 $\Delta A_{\text{标准}} = A2 - A1$ 。以吸光度（ $\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}$ ）为横坐标（x），浓度为纵坐标（y）做标准曲线。

6. 样本管依次加入700 μL 试剂三，100 μL 试剂四，100 μL 试剂五，10 μL 试剂六（加入试剂六即开始计时），迅速混匀后，测定412nm处30s和150s光吸收A1和A2， $\Delta A_{\text{测定}} = A2 - A1$ 。

三、GSSG含量计算

根据标准曲线，将样本（ $\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}$ ）带入公式中（x），计算出样本浓度y（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。

(1) 按蛋白浓度计算

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

(2) 按样本质量计算

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

(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，1mL；V样：加入反应体系中上清液体积，100 μL =0.1mL；W：样本质量，g；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；细胞数量：以 10^6 为单位计量；2：血浆（血细胞）稀释一倍。

注意事项：

1. 样本处理需匀浆完全，若当天不能完成测量，可放-80℃保存。
2. 若不确定样本中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. 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。
5. 如果样本量过多，可将试剂三与试剂六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。
6. 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。



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