

## 氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 含量测定试剂盒说明书

(货号: G0207F 分光法 48 样)

### 一、产品简介:

谷胱甘肽通常以还原型状态(GSH) 存在,但是GSH在氧化应激的作用下会转化为氧化型状态 (GSSG)。因此GSH/GSSG的比值被认为是氧化应激研究的一个重要指标。

本试剂盒含有 GSH 掩蔽剂,加入掩蔽剂可以除去样品溶液中的 GSH,并在谷胱甘肽还原酶作用下使氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 转化为还原型谷胱甘肽 (GSH),进而与 DTNB 与反应生成在 412nm 处有特征吸收峰的复合物;进而对 GSSG 进行定量。

### 二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 $\mu\text{L}$ ×1 支	4℃ 保存	临用前取 45 $\mu\text{L}$ 的试剂一至一支新的 EP 管中,加 1.5mL 的乙醇混匀后测定 (共配制 2 支即可)。
试剂二	EP 管×2 支	-20℃ 保存	用前甩几下或 4℃ 离心使试剂落入试管底部,每支加 0.6mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20℃ 保存,禁止反复冻融,一星期内用完。
试剂三	液体 2mL×1 瓶	4℃ 保存	若凝固,可在 25℃ 水浴温育片刻至全部融解后使用。
试剂四	液体 28mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂五	液体 10 $\mu\text{L}$ ×1 支	-20℃ 保存	用前甩几下或 4℃ 离心使试剂落入试管底部,再加 1.1 mL 蒸馏水溶解备用。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃ 保存	若重新做标曲,则用到该试剂。

### 三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、低温离心机、水浴锅、可调节移液器、蒸馏水。

### 四、氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 含量的测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

#### 1、样本制备:

① 组织样本:称取约 0.1g 组织,加入 1mL 提取液,进行冰浴匀浆。4℃×12000rpm 离心 15min,取上清液,置冰上待测。

【注】:根据研究需求,可按组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本:先收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液;超声波破碎细菌或细胞 (功率 300w, 超声 3 秒,间隔 7 秒,总时间 3min); 4℃×12000rpm 离心 15min,取上清液,置冰上待测。

【注】:若增加样本量,可按照细菌/细胞数量 ( $10^4$  个): 提取液体积(mL)为 500~1000: 1 的比例提取

③ 液体样本:直接检测。若浑浊,离心后取上清检测。

#### 2、上机检测

① 可见分光光度计预热 30min,调节波长到 412nm,蒸馏水调零。

② 所有试剂在使用前需在 25℃ 水浴中保温 10min。若批量测定则试剂二和三和四可按照

20:40:520 配成混合液，按照 580 $\mu$ L 加样量操作。

③ 在 1mL 玻璃比色皿中依次加入：

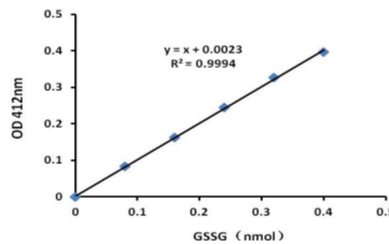
试剂名称 ( $\mu$ L)	测定管
样本	80
试剂一	40
轻轻混匀，孵育 10 分钟	
试剂二	20
试剂三	40
试剂四	520
试剂五	20
混匀，室温 (25 $^{\circ}$ C) 下，立即于 412nm 读取吸光值 A1，25min 后读取吸光值 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】1. 若  $\Delta A$  在零附近徘徊，可增加样本加样量（如增至 160 $\mu$ L），则试剂四相应减少，保持反应总体积 720 $\mu$ L 不变。

2. 严格控制反应时间于 25min 读值。

## 五、结果计算：

1、标准曲线方程为  $y = x + 0.0023$ ；x 为标准品质量 (nmol)，y 为  $\Delta A$ 。



2、按样本鲜重计算：

$$\text{GSSG}(\text{nmol/g 鲜重}) = (\Delta A - 0.0023) \div 1 \div (W \times V1 \div V) = 12.5 \times (\Delta A - 0.0023) \div W$$

3、按细胞数量计算：

$$\text{GSSG}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A - 0.0023) \div 1 \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) = 12.5 \times (\Delta A - 0.0023) \div \text{细胞数量}$$

4、按照液体体积计算：

$$\text{GSSG}(\text{nmol/mL}) = (\Delta A - 0.0023) \div 1 \div V1 = 12.5 \times (\Delta A - 0.0023)$$

V---加入提取液体积，1mL；

V1---反应中加入样本体积，80 $\mu$ L = 0.08mL；

W---样品质量，g；

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液 (10 $\mu$ mol/mL)：标准品溶于 1.06mL 蒸馏水中，（母液需在两天内用且 -20 $^{\circ}$ C 保存）。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 1, 2, 3, 4, 5 nmol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样体系操作，根据结果即可制作标准曲线。

【注意事项】：

1. 粗提液不能用于测定可溶性蛋白含量。
2. 一些还原剂如抗坏血酸，巯基乙醇，二硫苏糖醇 (DTT) 和半胱氨酸，或巯基反应性化合物如马来酰亚胺化合物会干扰谷胱甘肽测定。因此在样品制备过程中应避免使用这些物质。