

氧化型谷胱甘肽（GSSG）含量测定试剂盒说明书

（货号：BP10216W-196 微板法 196 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 200mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂一	液体 1 支	-20℃避光保存	1. 临用前取 60μL 的试剂一至一支新的 EP 管中，加 1mL 的乙醇混匀后测定； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	EP 管 2 支	-20℃保存	每支： 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 1.2mL 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 支	4℃避光保存	1. 若凝固，可在 25℃水浴温育片刻至全部融解后使用； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	液体 20μL×1 瓶	-20℃保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加 2.2 mL 蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉体 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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（10⁴ 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、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min，调节波长到 412nm，所有试剂在使用前需在 25℃水浴中保温 10min。
- ② 加入试剂一时，请务必全部加入到样本液体中；若批量测定则试剂二和三和四可按照 10:10:140 配成混合液，按照 160μL 加样量操作。
- ③ 在 96 孔板中依次加入：

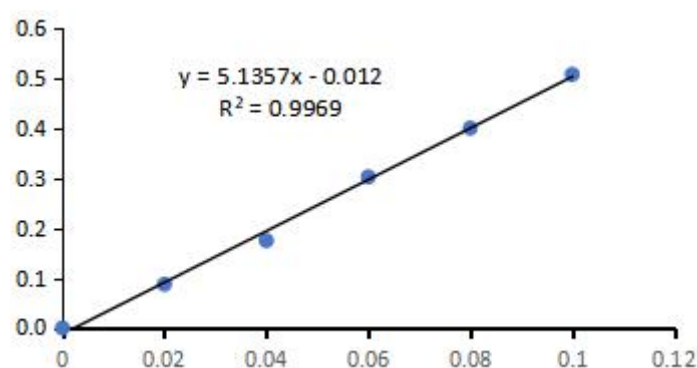
试剂组分 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	10
轻轻混匀，孵育 10 分钟	
试剂二	10
试剂三	10
试剂四	140
试剂五	10
混匀，室温（25℃）下，立即于 412nm 读取吸光值 A1，25min 后读取吸光值 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】1.若 ΔA 在零附近徘徊，可增加样本加样量（如增至 40μL），则试剂四相应减少，保持反应总体积 200μL 不变。

2.严格控制反应时间于 25min 读数。

五、结果计算：

- 1、标准曲线方程为 $y = 5.1357x - 0.012$ ；x 为标准品质量（nmol），y 为 ΔA 。



- 2、按样本鲜重计算：

$$\text{GSSG}(\text{nmol/g 鲜重}) = (\Delta A + 0.012) \div 5.1357 \div (W \times V1 \div V) = 9.74 \times (\Delta A + 0.012) \div W$$

- 3、按蛋白浓度计算：

$$\text{GSSG}(\text{nmol/mg prot}) = (\Delta A + 0.012) \div 5.1357 \div (Cpr \times V1 \div V) = 9.74 \times (\Delta A + 0.012) \div Cpr$$

- 4、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{GSSG}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A + 0.012) \div 5.1357 \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \\ &= 9.74 \times (\Delta A + 0.012) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

- 5、按照液体体积计算：

$$\text{GSSG}(\text{nmol/mL}) = (\Delta A + 0.012) \div 5.1357 \div V1 = 9.74 \times (\Delta A + 0.012)$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---反应中加入样本体积, 20 μ L =0.02mL;

W---样品质量, g;

附：标准曲线制作过程：

- 1 标准品溶于 1.06mL 蒸馏水中, (母液需在两天内用且-20℃保存), 标准品母液浓度为 10 μ mol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 1, 2, 3, 4, 5 nmol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下:

吸取标准品母液 500uL, 加入 500uL 蒸馏水, 混匀得到 5 μ mol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μ mol/mL	0	1	2	3	4	5
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据测定管的加样表操作, 根据结果, 以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值, 过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	20	
蒸馏水		20
试剂一	10	10
轻轻混匀, 孵育 10 分钟		
试剂二	10	10
试剂三	10	10
试剂四	140	140
试剂五	10	10
混匀, 室温 (25℃) 下, 立即于 412nm 读取吸光值 A, $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		

【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 (D TT) 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。