

氧化型谷胱甘肽（GSSG）含量测定试剂盒说明书

（货号：ADS-F-G002 分光法 48 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 60mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂一	液体 1 支	-20℃避光保存	1. 临用前取 45 μL 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); 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 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℃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 28mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	液体 10μL×1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 1.1 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）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、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 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580μL加样量操作。
- ③ 在1mL玻璃比色皿中依次加入:

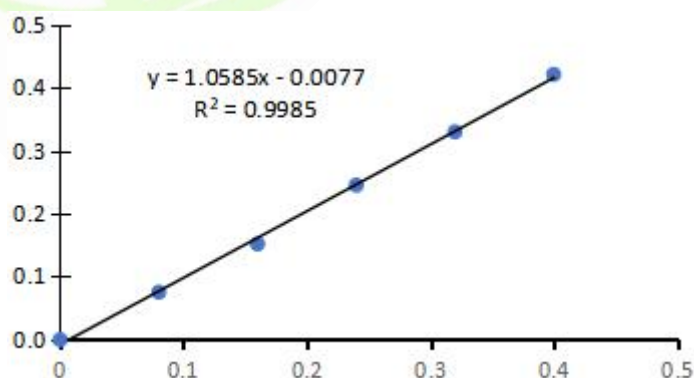
试剂组分(μL)	测定管
样本	80
试剂一	40
轻轻混匀,孵育10分钟	
试剂二	20
试剂三	40
试剂四	520
试剂五	20
混匀,室温(25℃)下,立即于412nm读取吸光值A1,25min后读取吸光值A2,ΔA=A2-A1。	

【注】1.若ΔA在零附近徘徊,可增加样本加样量(如增至160μL),则试剂四相应减少,保持反应总体积720μL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 $y = 1.0585x - 0.0077$; x 为标准品质量(nmol), y 为ΔA。



- 2、按样本鲜重计算:

$$\text{GSSG}(\text{nmol/g 鲜重}) = (\Delta A + 0.0077) \div 1.0585 \div (W \times V1 \div V) = 11.8 \times (\Delta A + 0.0077) \div W$$

- 3、按细胞数量计算:

$$\text{GSSG}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A + 0.0077) \div 1.0585 \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) = 11.8 \times (\Delta A + 0.0077) \div \text{细胞数量}$$

- 4、按照液体体积计算:

$$\text{GSSG}(\text{nmol/mL}) = (\Delta A + 0.0077) \div 1.0585 \div V1 = 11.8 \times (\Delta A + 0.0077)$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---反应中加入样本体积, 80μL=0.08mL;

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 10μmol/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 5μmol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μmol/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 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	80	
蒸馏水		80
试剂一	40	40
轻轻混匀, 孵育 10 分钟		
试剂二	20	20
试剂三	40	40
试剂四	520	520
试剂五	20	20
混匀, 室温 (25℃) 下, 立即于 412nm 读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$		

【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。