



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

氧化型谷胱甘肽(GSSG)含量检测试剂盒(微量法)

货号: R41891

规格: 100T/96S

保质期: 6个月

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
试剂-A	100mL×1瓶	2-8℃保存
试剂-B	130μl×1支	2-8℃保存
试剂-C	20mL×1瓶	2-8℃保存
试剂-D	2.5mL×1瓶	2-8℃保存
试剂-E	粉剂×1瓶	2-8℃保存; 临用前加入2.5 mL蒸馏水, 溶解后-20℃分装保存
试剂-F	液体12.5μl×1瓶	2-8℃保存; 临用前根据用量将其与蒸馏水按 1:20(V:V)的比例配制备用, 现用现配
标准品	粉剂×1瓶	2-8℃保存

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

简介

意义: 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。

原理: 利用谷胱甘肽能和 5, 5'-二硫代-双-(2-硝基苯甲酸) (5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoic 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。



自备用品:

天平、研钵或匀浆器、可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅、微量玻璃比色皿/96孔板、蒸馏水。

粗酶液提取:

1. 组织: 新鲜组织先用 PBS 冲洗 2 次, 然后称取动物组织或者植物组织 0.1g, 放入用 试剂-A 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-A (组织/试剂-A 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)。

2. 细胞: 收集不少于 500 万个细胞, 先用 PBS 清洗细胞 2 次 (PBS 重悬细胞, 600g 离心 10 分钟), 加入 1ml 试剂-A 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)。

3. 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-A, 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-A, 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)。

测定步骤:

1. 分光光度计或酶标仪预热 30min, 调节波长到 412nm, 蒸馏水调零。
2. 试剂-B 置于 25℃ (一般物种) 或者 37℃ (哺乳动物) 水浴中保温 30min。
3. 标准品的稀释: 将标准品用 1ml 蒸馏水溶解, 浓度为 1mg/ml; 再取适当溶液配制浓度为 15μg/ml、10μg/ml、5μg/ml、2.5μg/ml、1.25μg/ml、0μg/ml 的标准品 (用 试剂-A 十倍稀释后进行稀释)。
4. 按下表依次加入下列试剂



试剂名称	标准管(ul)	测定管(ul)
标准液	20	
样品		20
试剂-B	1	1
盖紧后混匀, 置于37°C水浴30min;开盖后依次加入		
试剂-C	140	140
试剂-D	20	20
试剂-E	20	20
试剂-F	2	2
迅速混匀后, 测定30s和150s光吸收A1和A2(标准管)和A3和A4(测定管), ΔA 标准= $A2-A1$, ΔA 样品= $A4-A3$		

GSSG 含量计算公式:

以吸光度 ΔA 标准为横坐标 (x), 浓度为纵坐标 (y) 做标准曲线, 然后根据标准曲线, 将 ΔA 样品带入公式中 (x), 计算出样品浓度 y ($\mu\text{g/ml}$)。

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:

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

3. 按细胞数量计算

$$\text{GSSG } (\mu\text{g} / 10^6 \text{cell}) = y \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) = y \div \text{细胞数量}$$

4. 按照液体体积计算

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

注: $V_{\text{样总}}$: 上清液总体积, 1 mL; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积, 20 μL =0.02 mL; W: 样品质量, g; C_{pr} : 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. 因为 试剂-A 中含有蛋白质沉淀剂, 因此上清液不能用于测定蛋白含量, 需另行测定。



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

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。



源叶