

氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 含量检测试剂盒 (可见分光光度法)

(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0247	氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 含量检测试剂盒	50 管/48 样

产品内容

名称	规格	储存条件
试剂一	液体 50mL×1 瓶	4℃
试剂二	170μL×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, 用前 8mL 蒸馏水溶解。溶解后-20℃分装保存	4℃
试剂六	液体 40μL×1 支, 用前 0.8mL 蒸馏水稀释。	4℃
标准品	粉剂 10mg×1 支	4℃, 避光

一、产品说明

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-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。

二、自备材料

分析天平、微量匀浆器 (规格 2mL) 低温离心机、水浴锅、移液器、可见分光光度计、1mL 比色皿。

三、样品制备

- 1、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)
- 2、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)

- 3、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)
- 4、细胞: 收集不少于 10⁶ 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)。

四、操作步骤

正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30min, 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、标准品稀释: 将标准品用 1mL 蒸馏水溶解(4℃保存), 浓度为 10mg/mL。取适当溶液配制浓度为 2.5μg/mL、20μg/mL、12.5μg/mL、6.25μg/mL、3.125μg/mL、0μg/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 100μL 稀释好的标准品或样品, 加入 2μL 试剂二, 混匀后 37℃孵育 30 分钟。
- 5、制作标准曲线: 孵育完成后标准管依次加入 700μL 试剂三, 100 μL 试剂四, 100 μL 试剂五, 10 μL 试剂六, 迅速混匀后, 测定 412nm 处 30 s 和 150 s 光吸收 A1 和 A2。吸光度(A2-A1)为横坐标(x), 浓度为纵坐标(y)做标准曲线。
- 6、样品管依次加入 700μL 试剂三, 100 μL 试剂四, 100 μL 试剂五, 10 μL 试剂六, 迅速混匀后, 测定 412nm 处 30 s 和 150 s 光吸收 A1 和 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。

五、GR 酶活的计算

根据标准曲线, 将样品 ΔA 带入公式中(x), 计算出样品浓度 y (μg/mL)。

1、按蛋白浓度计算

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

2、按样本鲜重计算

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

3、按细胞数量计算

$$\text{GSSG} (\mu\text{g} / 10^4 \text{ cell}) = y \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) = y \div \text{细胞数量}$$

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, 1 mL; V 样: 加入反应体系中上清液体积, 100μL=0.1 mL; W: 样品质量, g; Cpr: 上清液蛋白质浓度, mg/mL; 细胞数量, 以 10⁶ 为单位计量; 2: 血浆(血细胞) 稀释一倍。

六、注意事项

- 1、样品处理需匀浆完全, 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。
- 4、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。