氧化型谷胱甘肽（GSSG）含量检测试剂盒（微量法）
（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
YFX0248	氧化型谷胱甘肽（GSSG）含量检测试剂盒（微量法）	100 管/96 样

产品内容

名称	规格	储存条件
试剂一	液体 100mL × 1 瓶	4℃
试剂二	液体 130μL × 1 瓶	4℃
试剂三	液体 20mL × 1 瓶	4℃
试剂四	液体 2.5mL × 1 瓶	4℃
试剂五	粉剂 × 1 瓶:用前加入 2.5mL 蒸馏水溶解。溶解后-20℃分装保存。	4℃
试剂六	液体 12.5μL×1 支：用前加入 0.25mL 蒸馏水溶解。	4℃
标准品	粉剂 10mg×1 支	4℃

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-nitrobenoicacid，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、匀浆器/研钵、低温离心机、水浴锅、移液器、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板。

三、样品准备

1、组织：新鲜组织首先用 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、细胞/细菌：收集不少于 10^6 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）。

3、血浆样本：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）。

4、血细胞样本：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）。

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、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 412nm，分光光度计蒸馏水调零。
2、试剂三置于 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(4℃保存)，浓度为 10mg/mL。取适当溶液配制浓度为 25μg/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 0.5mL 离心管，加入 20μL 稀释好的标准品或样品，加入 1μL 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 140μL 试剂三，20 μL 试剂四，20 μL 试剂五，2 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 140μL 试剂三，20 μL 试剂四，20 μL 试剂五，2 μL 试剂六，迅速混匀后，测定 412nm 处 30 s 和 150 s 光吸收 A1 和 A2，△A= A2- A1。

五、GSSG 含量的计算

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

1、按照组织蛋白浓度计算

GSSG（μg/mg prot）=y×V 样÷(V 样×Cpr)=y÷Cpr。

2、按照样本鲜重计算

GSSG（μg/g 鲜重）= y×V 样÷(V 样÷V 样总×W)= y ÷W。

3、按照细菌/细胞密度计算

GSSG（μg/10^4 cell）= y×V 样÷(V 样÷V 样总×细胞数量)= y÷细胞数量。

4、按照血清/血浆体积计算

GSSG（μg/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，20μL=0.02 mL；W：样品质量，g ；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；细胞数量，以 106 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。