

氧化型谷胱甘肽（GSSG）含量检测试剂盒

（货号：SH3010 酶标法 96T）

一、产品简介

氧化型谷胱甘肽（GSSG）是谷胱甘肽（GSH）的氧化产物，GSSG 与 GSH 的比率直接反映了细胞清除活性氧（ROS）的能力与氧化损伤的程度。当机体受到内源或外源氧化胁迫时，GSH 被大量消耗以中和自由基，导致 GSSG 积累，因此 GSSG 升高通常指示氧化还原平衡被打破。

二、检测原理

本试剂盒首先使用掩蔽剂与样本中原有的 GSH 特异性反应，去除 GSH 干扰。随后，在谷胱甘肽还原酶（GR）催化下，GSSG 被 NADPH 还原生成 GSH，新生成的 GSH 与 DTNB 反应生成黄色产物。通过测定 412 nm 处黄色产物的吸光度，与标准曲线比较，即可计算样本中 GSSG 的含量。

三、试剂盒组分与规格

试剂名称	规格	保存条件	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 2mL×1 支	4℃ 保存	
试剂二	粉剂×2 支	-20℃ 保存	用前甩几下或 4℃ 离心使试剂落入试管底部，每支加 1mL 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 1mL×1 支	4℃ 避光保存	若凝固，可在 25℃ 水浴温育片刻至全部融解后使用。
试剂四	液体 20mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂五	液体 1mL×1 支	4℃ 保存	
标准品	粉体×2 支	4℃ 保存	若需要做标曲，则用到该试剂

四、保存条件：4℃ 保存，6 个月有效。

五、所用到的仪器和用品

酶标仪、台式低温离心机、恒温水浴锅、可调式移液器、96 孔板、匀浆器。

六、氧化型谷胱甘肽（GSSG）含量测定

正式实验前务必选取 2-3 个预期差异较大的样本做测定，了解本批样本情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

①组织样本：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，在 4℃ 12000g 离心 10min，取上清待测。

【注】若增加样本量，可以按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 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；按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000g 4℃ 离心 10min，取上清待测。

③液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测

①酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 412nm。

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、三、四、五可按照 10：10：130：10 配成混合液，按照 160 μ L 加样量操作。

③在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（ μ L）	测定管
样本	20
试剂一	20
混匀，室温（25℃）孵育 10min。	
试剂二	10
试剂三	10
试剂四	130
试剂五	10
混匀，室温（25℃）下，立即在 412nm 处测吸光值 A1，10min 后测吸光值 A2， $\Delta A=A2-A1$	

七、结果计算

1、根据标准曲线，计算 ΔA 对应的标准品 GSSG 浓度 C（单位为 nmol/mL）。例如本说明书中的标准曲线为 $y=0.1657x+0.0092$ ，则 $C=(\Delta A-0.0092)/0.1657$ 。

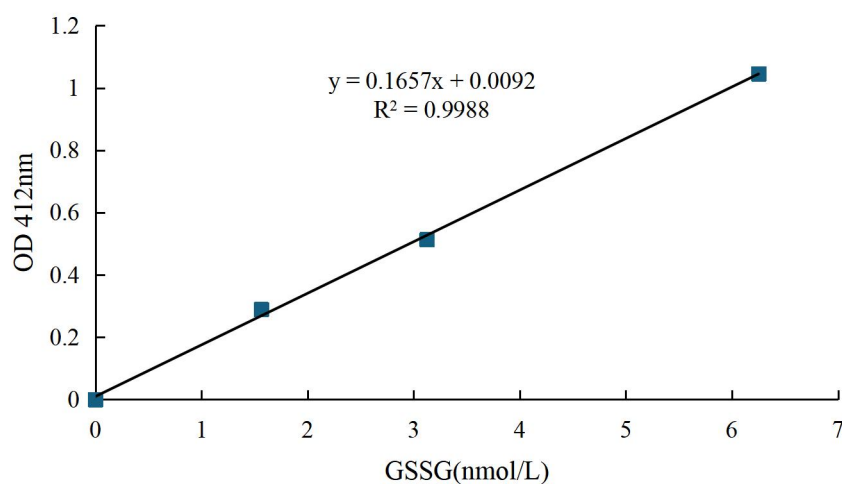


图 1 GSSG 检测试剂盒的标准曲线效果图，图中数据仅供参考。

2、按照样本鲜重计算：

$$\text{GSSG 含量 (nmol/g 鲜重)} = C \times V1 \div (W \times V1 \div V) \times D$$

3、按照细菌或细胞数量计算：

$$\text{GSSG 含量 (nmol/10}^4\text{cell)} = C \times V1 \div (500 \times V1 \div V) \times D$$



4、按照液体体积计算:

GSSG 含量 (nmol/mL) = C × D

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.02mL;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

W---样本质量, g;

500---细胞数量, 万;

注意事项:

1. 上清液不能用于蛋白质浓度测定。
2. 一些还原剂如抗坏血酸, 巯基乙醇, 二硫苏糖醇 (DTT) 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。因此在样本制备过程中应避免使用这些物质。

八、标准曲线制作

- 1、制备标准品母液 (1 μmol/mL): 标准品溶于 1 mL 蒸馏水中 (母液需在两天内用且-20℃保存)。
- 2、把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 1, 2, 3, 4, 5nmol/mL。也可以根据实际样本来调整校准品浓度。
- 3、依据测定管的加样体系操作, 根据结果即可制作标准曲线。