

氧化型谷胱甘肽含量测定试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

GSH/GSSG 是细胞内最重要的氧化还原对之一。因此，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，也是谷胱甘肽氧化还原循环的主要指标之一。

测定原理：

利用 2-VP 法测 GSSG 含量。

组成：

产品名称	GSH003-50T/48S	Storage
试剂一：液体	50ml	4°C
试剂二：液体	300 μ l	4°C
试剂三：液体	50ml	4°C
试剂四：液体	6ml	4°C
试剂五：液体	30 μ l	-20°C
试剂六：粉剂	1 瓶	4°C
说明书	一份	

试剂五：液体 30 μ l \times 1 瓶，-20°C 保存。临用前加入 0.6 ml 试剂三稀释，4°C 保存。

试剂六：粉剂 \times 1 瓶，4°C 保存。临用前加入 40 ml 试剂三溶解，现配现用。

自备仪器和用品：

可见分光光度计、低温离心机、水浴锅、可调节移液器、1ml 玻璃比色皿和蒸馏水。

粗酶液提取：

1. 组织：按照组织质量 (g)：试剂一体积(ml)为 1: 5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1ml 试剂一）进行冰浴匀浆。8000g 4°C 离心 10min，取上清液（如上清不清澈，再离心 3min）待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量 (10^4 个)：试剂一体积 (ml) 为 500~1000: 1 的比例（建议 500 万细胞加入 1ml 试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；8000g 4°C 离心 10min，取上清液（如上清不清澈，再离心 3min）的蒸馏水混匀待测。
3. 血清等液体：直接测定。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



测定操作:

1. 分光光度计预热 30 min, 调节波长到 412 nm, 蒸馏水调零。
2. 试剂三置于 25°C (一般物种) 或者 37°C (哺乳动物) 水浴中保温 30min。
3. **测定管:** 取 1 ml EP 管, 加入 **100 μ L 上清液**, 5μ L 试剂二, 盖紧后混匀, 置于 37°C 水浴 30min; 依次加入 100 μ L 试剂四, 10 μ L 试剂五, 700 μ L 试剂六, 迅速混匀后, 立即测定 30 s 和 150 s 光吸收 A1 和 A2, 计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

GSSG 含量计算公式:

1、标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.0276x - 0.0011$; x 为标准品浓度 (nmol/ml), y 为吸光值(ΔA)。

2、按蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{GSSG (nmol/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0011) \div 0.0276 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \\ &= 36.23 \times (\Delta A + 0.0011) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算

$$\begin{aligned} \text{GSSG (nmol/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0011) \div 0.0276 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \\ &= 36.23 \times (\Delta A + 0.0011) \div W \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{GSSG (nmol/10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A + 0.0011) \div 0.0276 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \\ &= 36.23 \times (\Delta A + 0.0011) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

5、按照液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{GSSG (nmol/ml)} &= (\Delta A + 0.0011) \div 0.0276 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \\ &= 36.23 \times (\Delta A + 0.0011) \end{aligned}$$

V 样: 反应中加入样本体积, 0.1ml; V 样总: 加入提取液体积, 1ml; W: 样品质量, g, Cpr: 样本蛋白浓度 (mg/ml)

注意事项:

1. 提取过程中去掉蛋白质, 所以提取液不能用于测定蛋白含量。
2. 临用前配制的试剂配好后 4°C 保存, 2 天内使用完毕。
3. 最低检出限为 0.1 μmol/L。
4. 反应温度. 严格来说, 为保证重复性, 应在 25°C 下进行反应。
5. 反应时间需精确控制, 否则会影响反应速率计算, 产生较大误差。
6. 样品中的 GSSG 浓度尽可能低一些, 否则反应速率太大, 没法控制, 所以稀释倍数要尽量大些。

