

氧化型谷胱甘肽含量测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

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	GSH004-100T/96S	Storage
试剂一：液体	100ml	4°C
试剂二：液体	600μl	4°C
试剂三：液体	50ml	4°C
试剂四：液体	2.5ml	4°C
试剂五：液体	15μl	-20°C
试剂六：粉剂	1 瓶	4°C
说明书	一份	

试剂五：液体 15μL×1 瓶，-20°C 保存。临用前加入 0.3ml 试剂三稀释，4°C 保存。

试剂六：粉剂×1 瓶，4°C 保存。临用前加入 20 ml 试剂三溶解，现配现用。

自备仪器和用品：

低温离心机、水浴锅、可调节移液器、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、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 (10⁴ 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）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



GSSG 含量测定:

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长到 412nm, 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. 取 1 ml EP 管, 加入 **100μl 上清液**, 5 μl 试剂二, 盖紧后混匀, 得混合液, 置于 37°C 水浴 30min; 取 21μl 混合液于 96 孔板, 然后依次加入 20 μl 试剂四、2 μl 试剂五和 140 μl 试剂六, 迅速混匀后, 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:

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

- 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

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

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, 20μL; 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)

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下

- 1、标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.0138x - 0.0011$; x 为标准品浓度 (nmol/ml), y 为吸光值(ΔA)。

2、按蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{GSSG (nmol/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0011) \div 0.0138 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \\ &= 72.46 \times (\Delta A + 0.0011) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算

$$\begin{aligned} \text{GSSG (nmol/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0011) \div 0.0138 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \\ &= 72.46 \times (\Delta A + 0.0011) \div W \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{GSSG (nmol/10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A + 0.0011) \div 0.0138 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \\ &= 72.46 \times (\Delta A + 0.0011) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

5、按照液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{GSSG (nmol/ml)} &= (\Delta A + 0.0011) \div 0.0138 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \\ &= 72.46 \times (\Delta A + 0.0011) \end{aligned}$$



V 样：反应中加入样本体积，20 μ L；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 $^{\circ}$ C 保存，2 天内使用完毕。
3. 最低检出限为 0.1 μ mol/L。
4. 反应温度严格来说，为保证重复性，应在 25 $^{\circ}$ 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。

