

氧化型谷胱甘肽（GSSG）检测试剂盒

简介：

氧化型谷胱甘肽(GSSG)是谷胱甘肽(GSH)的氧化形式，又称为二硫谷胱甘肽，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。

试剂盒组分：

试剂名称	规格：96T	保存条件
试剂一	液体×1瓶	2-8℃保存
试剂二	液体×3瓶	2-8℃保存
试剂三	液体×1瓶	2-8℃保存
试剂四	液体×1瓶	2-8℃保存
试剂五	粉剂×1瓶	2-8℃保存
试剂六	液体×1瓶	2-8℃保存
标准品	液体×1瓶	2-8℃保存
酶标板	96T	室温

本试剂盒可用于检测细胞、组织、血浆、血清、红血球、等样品。

样本处理：

- 血清样品:将收集于血清分离管中的全血标本在室温放置2小时或4℃过夜，然后1,000×g 离心15分钟，取上清即可，将上清置于≤-20℃冷冻保存，避免反复冻融。
- 血浆样品:用 EDTA或肝素钠抗凝管采集标本，并将标本在采集后的 30 分钟内于 4℃冰箱，1,000×g 离心15分钟，取上清即可检测，或将上清置于≤-20℃冷冻保存，避免反复冻融。
- 组织匀浆：
 - 在预冷 PBS(0.01mol/L, pH=7.0-7.2)中清洗去除血液，低温切割标本后，准确称取组织重量。
 - 按重量(g):体积(mL)=1:9的比例，加入9倍体积的匀浆介质PBS。用手工或匀浆器将标本充分匀浆。
 - 3000 ×g离心15分钟，仔细收集匀浆上清，弃沉淀，（如需要可取部分进行BCA蛋白定量），≤-20℃以下保存。
- 细胞裂解液:在分析试验之前，细胞需利用以下方法处理：
 - 贴壁细胞应该用冷 PBS 轻轻清洗，然后用胰蛋白酶消化，于 1,000×g 离心 5 分钟后收集，（悬浮细胞通过离心直接收集），将收集到的细胞用冷 PBS 洗3次。
 - 用 PBS 稀释细胞悬液，细胞浓度达到 100 万/ml 左右。通过超声破碎或反复冻融方式，以使细胞破坏并放出细胞内成份。3000 ×g离心15分钟，仔细收集上清，≤-20℃冷冻保存。

5. 细胞培养上清或其它生物体液标本:请 $3,000\times g$ 离心15分钟, 取上清即可检测, 或将上清置于 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存, 避免反复冻融。

二、检测步骤:

- 1、可见分光光度计/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、试剂二:有毒易挥发试剂, 涉及该试剂的步骤建议在通风橱内操作。
 - 3、试剂三放置 37°C , 水浴保温30min。
 - 4、试剂五:临用前加入 2.5 mL 蒸馏水, 溶解后 -20°C 分装可保存4周, 避免反复冻融。
 - 5、试剂六工作液:先将试剂六内液体离心至底部, 后用移液枪吹打混匀使用。临用前根据样本数量按照试剂六: 蒸馏水=1uL:20uL (21uL, 约10T) 的比例配制备用, 现用现配。
 - 6、标准品: 10mg氧化型谷胱甘肽。临用前加入1mL蒸馏水, 充分溶解, 浓度为10mg/mL。
 - 7、标准品稀释:吸取10mg/mL标准品, 用蒸馏水稀释至 125ug/mL、62.5ug/mL、31.25ug/mL、15.625ug/mL、7.8125ug/mL、3.90625ug/mL。
- 1、在EP管按下表步骤加样:

序号	标准品体积 (uL)	蒸馏水体积 (uL)	稀释后浓度 (ug/mL)
1	100	900	1000
2	125	875	125
3	100	100	62.5
4	100	100	31.25
5	100	100	15.625
6	100	100	7.8125
7	100	100	3.90625

- 2、操作步骤: (在微量玻璃比色皿/1.5ml的EP管内加入下列试剂, 勿用96孔板加样。)

试剂名称 (uL)	测定管	标准管	空白管
样本	20		
标准品		20	
蒸馏水			20
试剂二	1	1	1
37°C 孵育 30 分钟后, 加入下列试剂			
试剂三	140	140	140
试剂四	20	20	20
试剂五	20	20	20
试剂六工作液	2	2	2

加入试剂六工作液的同时开始计时, 迅速混匀 (若使用96孔板需快速转移至板中), 于 412nm 处测定 30s和150s的吸光值, 分别记为 A1测定、A1标准, A1空白和A2测定、A2 标准、A2 空白。 **计算:** ΔA 测定 = A2 测定 - A1测定, ΔA 标准 = A2标准 - A1标准, Δ 空白 = A2空白 - A1空白。空白管和标准曲线只需做1-2次。

注意: 1. 如果样本量过多, 可将试剂三与试剂六工作液按照比例混匀配成工作液, 在最后一步加入, 加入工作液即开始计时。用多少配多少。

2. 试剂二对 96 孔板有腐蚀性, 所以第一步 37°C孵育勿加到 96孔板中, 可统一加到 EP 管混匀后, 每管吸取200uL 转移至96孔板后进行测定。

三、GSSG含量计算：

1、绘制标准曲线：

以标准管的浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标x, 以 $(\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}})$ 为纵坐标 y, 绘制标准曲线。根据标准曲线。将 $(A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$ 带入公式计算样本浓度($\mu\text{g/mL}$)。

2、GSSG 含量计算：

(1) 按蛋白浓度计算: $\text{GSSG含量}(\mu\text{g/mg prot}) = X \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) = X \div C_{\text{pr}}$

(2) 按样本质量计算: $\text{GSSG含量}(\mu\text{g/g质量}) = X \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) = X \div W$

(3) 按细胞/细菌数量计算: $\text{GSSG含量}(\mu\text{g}/10^6 \text{ cell}) = X \times V \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times N) = X \div N$

(4) 按液体体积计算: $\text{GSSG含量}(\mu\text{g/mL}) = 2x$

$V_{\text{样总}}$: 上清液总体积, 1mL;

$V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积, 20L=0.02mL;

W : 样本质量, g;

C_{pr} : 上清液蛋白质浓度, mg/mL;

N : 细胞/细菌数量, 以 10^6 计;

2: 血浆(血细胞)稀释一倍。

注意事项：

- 1、若不确定样本中 GSSG 含量的高低, 可稀释几个梯度后再进行测量。
- 2、如果测定吸光值超过线性范围吸光值, 可以增加样云量或者稀释样本后再进行测定。
- 3、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。如需测定蛋白含量, 需另取组织。

金恒诺
JINHENGNUO