

氧化型谷胱甘肽（GSSG）含量测定试剂盒说明书

（微板法 96 样）

一、产品简介：

谷胱甘肽通常以还原型状态(GSH) 存在，但是GSH在氧化应激的作用下会转化为氧化型状态(GSSG)。因此GSH/GSSG的比值被认为是氧化应激研究的一个重要指标。

本试剂盒含有 GSH 掩蔽剂，加入掩蔽剂可以除去样品溶液中的 GSH，并在谷胱甘肽还原酶作用下使氧化型谷胱甘肽（GSSG）转化为还原型谷胱甘肽（GSH），进而与 DTNB 与反应生成在 412nm 处有特征吸收峰的复合物；进而对 GSSG 进行定量。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 μ L×1 支	4℃保存	临用前取 60 μ L 的试剂一至一支新的 EP 管中，加 1mL 的乙醇混匀后测定。
试剂二	EP 管×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 0.6mL 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℃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 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	液体 10 μ L×1 支	-20℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部，再加 1.1 mL 蒸馏水溶解备用。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、低温离心机、水浴锅、可调节移液器、蒸馏水。

四、氧化型谷胱甘肽（GSSG）含量的测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，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。4℃×12000rpm 离心 15min，取上清液，置冰上待测。

【注】：根据研究需求，可按组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：10 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；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液；超声波破碎细菌或细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；4℃×12000rpm 离心 15min，取上清液，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积(mL)为 500~1000：1 的比例提取

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，调节波长到 412nm，所有试剂在使用前需在 25℃水浴中保温 10min。

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和三和四可按照 10:10:140 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：

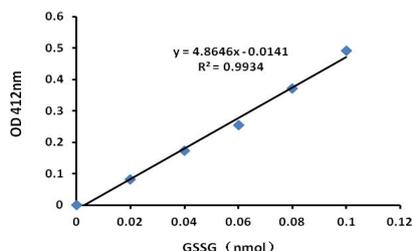
试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	10
轻轻混匀，孵育 10 分钟	
试剂二	10
试剂三	10
试剂四	140
试剂五	10
混匀，室温 (25°C) 下，立即于 412nm 读取吸光值 A1，25min 后读取吸光值 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】1.若 ΔA 在零附近徘徊，可增加样本加样量（如增至 40μL），则试剂四相应减少，保持反应总体积 200μL 不变。

2.严格控制反应时间于 25min 读值。

五、结果计算：

1、标准曲线方程为 $y = 4.8646x - 0.0141$ ；x 为标准品质量 (nmol)，y 为 ΔA 。



2、按样本鲜重计算：

$$\text{GSSG}(\text{nmol/g 鲜重}) = (\Delta A + 0.0141) \div 4.8646 \div (W \times V1 \div V) = 10.28 \times (\Delta A + 0.0141) \div W$$

3、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{GSSG}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A + 0.0141) \div 4.8646 \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \\ &= 10.28 \times (\Delta A + 0.0141) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4、按照液体体积计算：

$$\text{GSSG}(\text{nmol/mL}) = (\Delta A + 0.0141) \div 4.8646 \div V1 = 10.28 \times (\Delta A + 0.0141)$$

V---加入提取液体积，1mL；

V1---反应中加入样本体积，20μL = 0.02mL；

W---样品质量，g；

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液 (10μmol/mL)：标准品溶于 1.06mL 蒸馏水中，（母液需在两天内用且-20°C保存）。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 1, 2, 3, 4, 5 nmol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 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。

【注意事项】：

1. 粗提液不能用于测定可溶性蛋白含量。
2. 一些还原剂如抗坏血酸，巯基乙醇，二硫苏糖醇 (D TT) 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。因此在样品制备过程中应避免使用这些物质。