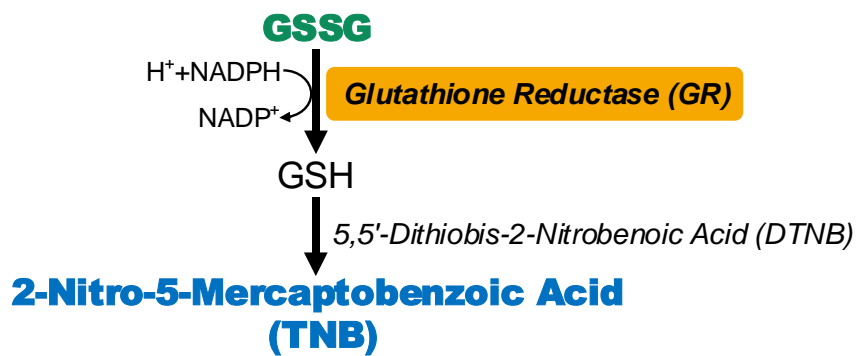




氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 含量检测试剂盒
Oxidized Glutathione (GSSG) Content Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 含量检测试剂盒

Oxidized Glutathione (GSSG) Content Assay Kit

一、产品描述

谷胱甘肽是一种含 γ -酰胺键和巯基的三肽，由谷氨酸、半胱氨酸及甘氨酸组成，广泛存在于动物、植物组织和微生物中，在生物体内能帮助免疫系统保持正常的功能，并具有抗氧化和整合解毒的作用。谷胱甘肽有还原型 (GSH) 和氧化型 (GSSG) 两种形式，GSSG 又称为二硫代谷胱甘肽，由两分子谷胱甘肽氧化而成，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，还原型与氧化型谷胱甘肽含量的比值可作为评估细胞氧化还原状态的主要动态指标。

通过 GSH 掩蔽剂去除样本中原有的 GSH，并在谷胱甘肽还原酶催化作用下将 GSSG 还原为 GSH，GSH 能够与 5,5'-二硫代-双-(2-硝基苯甲酸) (DTNB) 反应生成黄色的 2-硝基-5-巯基苯甲酸 (TNB)，产物在 412 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可定量检测氧化型谷胱甘肽的含量。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 120 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	液体 200 μ L×1 支	-20°C 保存	易挥发组分，注意密封保存
试剂三	液体 18 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂四	液体 3 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂五	粉剂×2 瓶	-20°C 保存	使用前加入 4 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存2周，避免反复冻融)
试剂六	液体 15 μ L×1 支	-20°C 保存	使用前按试剂六：蒸馏水=1:80 的体积比配制 (根据使用量现用现配，即为试剂六应用液)
试剂七	-	4°C 保存	使用前按试剂一：蒸馏水=1:9 的体积比配制 (根据使用量现用现配)
标准品	粉剂×1 支 (10 mg GSSG 标准品)	4°C 保存	使用前加入 1 mL 试剂七充分溶解 (即为 10 mg/mL GSSG 标准液)
标准稀释液的制备 (现用现配)：使用前将 10 mg/mL GSSG 标准液使用试剂七稀释至 60、50、40、20、10、5 μ g/mL 即为标准稀释液。			

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：酶标仪、96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1. 样品处理 (可根据预实验结果调整样本量及比例)

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 0.1 g 组织, 加入 1 mL 试剂一) 处理样品, 冰浴匀浆, 4°C 12000 g 离心 10 min, 取上清置于冰上待测。

②细菌或细胞: 离心收集细菌或细胞至离心管内, 按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 试剂一体积 (mL) 为 (500-1000) : 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 试剂一) 处理样品, 冰浴超声破碎 (功率 300 W, 超声 3 s, 间隔 7 s, 总时间 3 min), 4°C 12000 g 离心 10 min, 取上清置于冰上待测。

③血清 (浆)、培养液等液体样本: 吸取 100 μ L 液体样本, 加入 100 μ L 试剂一充分混匀, 4°C 12000 g 离心 10 min, 取上清置于冰上待测。

2. 测定步骤

①酶标仪预热 30 min 以上, 调节波长至 412 nm。

②试验前将试剂三 25°C 预热 30 min 以上, 检测过程中试剂五和试剂六应用液始终置于冰上放置。

③在离心管中依次加入下列试剂:

试剂	测定组 (μ L)	标准组 (μ L)	空白组 (μ L)
待测样本	50	-	-
标准稀释液	-	50	-
蒸馏水	-	-	50
试剂二	1	1	1
充分混匀, 37°C 反应 30 min 即为反应混合液			
在 96 孔板中依次加入下列试剂:			
反应混合液	20	20	20
试剂三	140	140	140
试剂四	20	20	20
试剂五	20	20	20
试剂六应用液	2	2	2

吸光值测定: ①充分混匀并立即开始计时, 测定 30 s (总时间) 时 412 nm 处吸光值, 记为 A1 测定、A1 标准和 A1 空白; ②准确反应 120 s, 测定 150 s (总时间) 时 412 nm 处吸光值, 记为 A2 测定、A2 标准和 A2 空白; ③计算 A 测定=A2 测定-A1 测定, A 标准=A2 标准-A1 标准, A 空白=A2 空白-A1 空白, Δ A 测定=A 测定-A 空白, Δ A 标准=A 标准-A 空白。注: 空白组只需测定 1-2 次。

标准曲线的建立: 以 60、50、40、20、10、5 μ g/mL 标准稀释液浓度为横坐标 (x), 以其对应的 Δ A 标准为纵坐标 (y), 绘制标准曲线, 得到标准方程 $y=kx+b$, 将 Δ A 测定带入公式中得到 x (μ g/mL)。

3.氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 含量计算

①按组织蛋白浓度计算

$$\text{GSSG } (\mu\text{g}/\text{mg prot}) = \frac{x \times V_{\text{样总}}}{\text{Cpr} \times V_{\text{样总}}} = \frac{x}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

$$\text{GSSG } (\mu\text{g}/\text{g}) = \frac{x \times V_{\text{样总}}}{W} = \frac{x}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

$$\text{GSSG } (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = \frac{x \times V_{\text{样总}}}{\text{细菌或细胞数量}} = \frac{x}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

$$\text{GSSG } (\mu\text{g}/\text{mL}) = \frac{x \times (V_{\text{液}} + V_{\text{提}})}{V_{\text{液}}} = 2 \times x$$

注释： V 样总：待测样本总体积，1 mL；V 液：液体样本提取过程中吸取液体样本的体积，0.1 mL；V 提：液体样本提取过程中加入试剂一的体积，0.1 mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计。

四、注意事项

- ①样品处理过程应在冰上迅速完成，提取后待测样本应置于冰上保存且建议当天完成测定；
- ②准确在 30 s 和 150 s 处完成吸光值测定，以确保实验结果的准确性和重复性；若同时测定多个样本时，应使用多道移液器且分批进行测定，以确保组间反应时间一致；
- ③试剂一中含有蛋白质沉淀剂，待测样本不能用于蛋白浓度测定，需另取组织使用 1×PBS 或生理盐水按照与待测样本相同的样本浓度重新提取后，再进行蛋白含量测定；
- ④若测定吸光值超出标准吸光值线性范围：高于最高值建议将待测样本使用试剂一适当稀释后再进行测定；低于最低值建议制备更高浓度样本后再进行测定，计算时相应修改；
- ⑤试剂二和试剂六试剂量较小，运输过程中可能会使试剂残留在管壁或管帽上，使用前建议先离心收集（可参考使用 1000 g 常温离心 1-2 min），再使用移液器缓慢吹打混匀后使用；
- ⑥试剂五配制后有效期较短，为便于试验安排，附赠 1 瓶作为备用；
- ⑦试剂二具有刺激性气味，建议使用时在通风橱中操作且做好防护措施；
- ⑧为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

