

氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 检测试剂盒 (微量法)

货号：PMK1024

保存：-20℃避光保存 12 个月

规格：48T/96T

检测范围：0.313μM-20μM 灵敏度：0.313μM

适用样本：动植物组织、细胞、血细胞、细菌、血清（浆）或其他液体

产品简介

谷胱甘肽有还原型 (GSH) 和氧化型 (GSSG) 两种形态，氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 是谷胱甘肽的氧化形式，又称为二硫代谷胱甘肽，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，也是谷胱甘肽氧化还原循环的主要指标之一。本试剂盒提供了一种简单的检测方法检测各种生物样本中 GSSG 的含量。还原型谷胱甘肽能和 5,5'-二硫代-双-(2-硝基苯甲酸) (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, DTNB) 反应生成 2-硝基-5-巯基苯甲酸，在波长 412nm 处具有最大光吸收，通过 2-乙烯吡啶抑制样品中原有的还原型谷胱甘肽，然后利用谷胱甘肽还原酶 (Glutathione reductase, GR) 将 GSSG 还原为 GSH，借此测定氧化型谷胱甘肽的含量。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液	50mL	100mL	4℃
反应缓冲液	10mL	20mL	4℃
试剂一	300 μL	600 μL	-20℃避光保存
试剂二	10 μL	20 μL	4℃避光保存
试剂三	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	-20℃避光保存
试剂四	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	4℃避光保存
标准品	粉剂×1 支	粉剂×1 支	4℃避光保存

自备耗材

酶标仪或可见光分光光度计（能测 412nm 处的吸光度）及恒温箱
96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头
制冰机、低温离心机、去离子水、匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。

提取液：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

反应缓冲液：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂一：即用型；使用前，避光平衡到室温；-20℃避光保存。

试剂二稀释液：使用时，按取试剂二 6μL 加水 0.12mL 的比例配制，整个实验过程中，冰上避光放置。现用现配，用多少配多少；4℃避光保存。

试剂三：使用前 96T 加 2.5mL 水，48T 加 1.25mL 水溶解；分装-20℃避光保存。

试剂四：使用前 96T 加 2.5mL 水，48T 加 1.25mL 水溶解；4℃避光保存。

产品说明书

标准品制备:

稀释提取液: 按 1:10 的比例用去离子水稀释提取液, 如: 取 250 μL 提取液加入 2,250 μL 去离子水。

20mM GSSG 标准品: 取 1 管标准品, 用 1mL 稀释后的提取液溶解得 20mM GSSG 标准品; 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

20 μM GSSG 标准品: 取 1 μL 20mM GSSG 标准品用 999 μL 稀释后的提取液稀释, 使用 20 μM GSSG 标准品, 按照下表所示, 进一步稀释标准品:

	标准品体积 (μL)	稀释后的提取液体积 (μL)	标准品浓度 (μM)
Std. 1	200	0	20
Std. 2	100 μL of Std. 1	100	10
Std. 3	100 μL of Std. 2	100	5
Std. 4	100 μL of Std. 3	100	2.5
Std. 5	100 μL of Std. 4	100	1.25
Std. 6	100 μL of Std. 5	100	0.625
Std. 7	100 μL of Std. 6	100	0.313

注意: 每次实验都要做一次标准品检测, 制作标曲; 稀释后的标准品溶液不稳定, 必须在 4 小时内使用。

样本制备

动物组织: 称取 0.1g 组织样本, 加入 1mL 预冷的提取液, 快速冰上匀浆。匀浆后的样本, 8,000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10min, 取上清液, 置冰上待测。

植物组织: 称取 0.1g 植物组织剪碎, 加入 1mL 预冷的提取液, 快速冰上匀浆。匀浆后的样本冰浴超声波破碎 5min (功率 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 7s, 重复 30 次)。超声后的样本, 8,000g, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10min, 取上清液, 置冰上待测。

血清或血浆: 按常规方法收集血清, 加入等体积的提取液, 4 $^{\circ}\text{C}$, 8,000g 离心 10min, 取上清液, 置冰上待测。将收集的抗凝血于 4 $^{\circ}\text{C}$, 600g 离心 10min, 30min 内吸取上层血浆到另一支试管中, 加入等体积的提取液, 4 $^{\circ}\text{C}$, 8,000g 离心 10min, 取上清液, 置冰上待测。

血细胞: 将收集的抗凝血于 4 $^{\circ}\text{C}$, 600g 离心 10min, 弃去上层血浆, 用 PBS 重悬, 收集 5×10^6 个血细胞, 用冷 PBS 清洗 2 次 (用 PBS 重悬血细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$ 600g 离心 10min), 加入 1mL 预冷的提取液, 冰浴超声波破碎 5min (功率 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 7s, 重复 30 次)。超声后的样本, 8,000g, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10min, 取上清液, 置冰上待测。

细胞或细菌: 收集 5×10^6 个细胞或细菌, 首先用冷 PBS 清洗细胞 2 次 (用 PBS 重悬细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$ 600g 离心 10min), 加入 1mL 预冷的提取液重悬细胞或细菌, 冰浴超声波破碎 5min (功率 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 7s, 重复 30 次)。超声后的样本, 8,000g, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10min, 取上清液, 置冰上待测。

注意: 推荐使用新鲜样本, 如果不立即进行实验, 样本可在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存 1 个月。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。

实验步骤

1. 酶标仪或可见光分光光度计预热 30 min 以上, 调节波长至 412nm, 可见光分光光度计去离子水调零。
2. 试剂二稀释液、试剂三和试剂四 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10min。
3. 在 EP 管中按照如下方式加样:

试剂 (μL)	空白	标准	测定
去离子水	0	0	90
稀释后的提取液	100	0	0
标准品	0	100	0
样本	0	0	10
试剂一	5	5	5

混匀，37℃孵育 30min，取 21μL 混合液于微量玻璃比色皿或 96 孔板中

混合液	21	21	21
反应缓冲液	140	140	140
试剂二稀释液	2	2	2
试剂三	20	20	20
试剂四	20	20	20

4. 充分混匀，37℃避光孵育 10min，记录 10min 时的吸光度 $A_{空}$ 、 $A_{标}$ 、 $A_{测}$ 。计算 $\Delta A_{测}=A_{测}-A_{空}$ ， $\Delta A_{标}=A_{标}-A_{空}$ （空白管只需做 1 管）。

注意：1. 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果 $\Delta A_{测}$ 小于 0.005 可适当加大样本量。如果 $\Delta A_{测}$ 大于 2.0，样本可用去离子水进一步稀释，计算结果乘以最终稀释倍数。

2. 如果样本量过多，可将反应缓冲液、试剂二稀释液与试剂三按照比例混匀配成工作液加入。

结果计算

1. 标准曲线的绘制

以标准品浓度为 y 轴， $\Delta A_{标}$ 为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。

2. 含量计算

将 $\Delta A_{测}$ 带入方程得到 y 值（1μM=1nmol/mL）。

(1) 按样本鲜重计算

$$GSSG \text{ (nmol/g 鲜重)} = y \times V_{样} \div (W \times V_{样} \div V_{样总}) \times 10 \times n = 10y \div W \times n$$

(2) 按液体样本体积计算

$$GSSG \text{ (nmol/mL)} = 2 \times y \times V_{样} \div V_{样} \times 10 \times n = 20y \times n$$

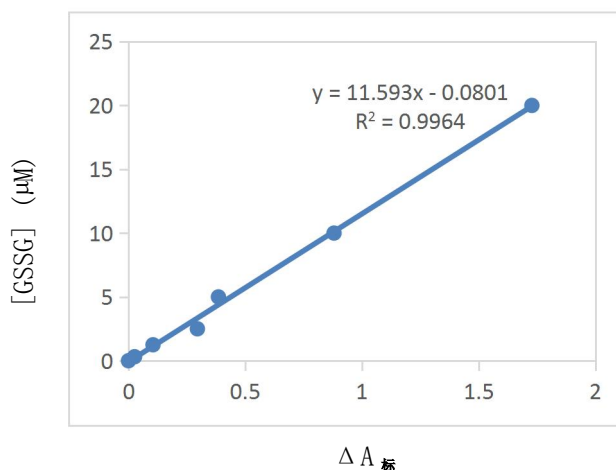
(3) 按细胞数目计算

$$GSSG \text{ (nmol}/10^4 \text{ cells)} = y \times V_{样} \div (500 \times V_{样} \div V_{样总}) \times 10 \times n = 0.02y \times n$$

$V_{样}$ ：反应中加入样本体积，0.002mL，根据比例折算 $10\mu\text{L} \times (21 \div 105) = 2\mu\text{L}$ ；W：样本质量，g； $V_{样总}$ ：加入提取液体积，1mL；10：样本检测时的稀释倍数， $(10+90) \div 10$ ；2：液体样本制备时的稀释倍数，加入等体积的提取液即稀释 2 倍；n：样本进一步稀释的稀释倍数；500：细胞数量，500 万。

结果展示

典型标准曲线-以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。

产品说明书

4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1023 还原型谷胱甘肽（GSH）检测试剂盒（微量法）

PMK1879 GSH 和 GSSG 检测试剂盒（微量法）

PMK1022 谷胱甘肽还原酶（GR）检测试剂盒（微量法）

PMK1027 谷胱甘肽 S-转移酶（GST）检测试剂盒（微量法）

PMK1025 谷胱甘肽过氧化物酶（GPX）检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

