

氧化型谷胱甘肽（GSSG）含量检测试剂盒说明书

微量法

货号：AC10259

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 100 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	液体 130 μL×1 支	4°C保存
试剂三	液体 20 mL×1 瓶	4°C保存
试剂四	液体 2.5 mL×1 瓶	4°C保存
试剂五	粉剂×1 瓶	4°C保存
试剂六	液体 12.5 μL×1 瓶	4°C保存
标准品	粉剂 10 mg×1 支	4°C保存

溶液的配制：

- 1、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。
- 2、试剂五：临用前加入 2.5 mL 蒸馏水，溶解后-20°C分装保存；
- 3、试剂六：液体置于试剂瓶内 EP 管中。临用前根据样本量将试剂六、蒸馏水按 1:20 (V:V) 的比例配制备用，现用现配；
- 4、标准品：用 1 mL 蒸馏水溶解，浓度为 10 mg/mL，4°C保存。

产品说明：

氧化型谷胱甘肽（GSSG）是谷胱甘肽（GSH）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。本试剂盒利用谷胱甘肽能和 5,5'-二硫代-双-(2-硝基苯甲酸) (5,5'-dithiobis-2-nitrobenoic acid, DTNB) 反应产生 2-硝基-5-巯基苯甲酸，2-硝基-5-巯基苯甲酸在波长 412nm 处具有最大光吸收的特点，通过 2-乙酰吡啶抑制样本中原有的还原型谷胱甘肽，然后利用谷胱甘肽还原酶将 GSSG 还原为 GSH，借此测定氧化型谷胱甘肽的含量。

技术指标：

最低检出限：3.211 μg/mL

线性范围：3.9-125 μg/mL

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

分析天平、匀浆器/研钵、低温离心机、水浴锅、移液器、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96孔板。

操作步骤:

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

（1）组织处理

新鲜组织首先用 PBS 冲洗 2 次，然后称取动物组织或者植物组织 0.1g。加入用试剂一润洗过的匀浆器中（匀浆器提前放冰上预冷）；然后加入 1mL 试剂一（组织/试剂一比例保持不变即可），迅速冰上充分研磨（使用液氮研磨效果更好）；8000g，4℃离心 10min；取上清液放置于 4℃待测，若暂时不能完成测试可放于-80℃保存（可保存 10 天）。

（2）血液处理

血浆 将收集的抗凝血于 4℃，600g 离心 10 分钟，吸取上层血浆到另一支试管中，加入等体积的试剂一，4℃，8000g 离心 10 分钟，将上清移入新的试管中放置于 4℃待测，若暂时不能完成测试可放于-80℃保存（可保存 10 天）。

血细胞：将收集的抗凝血于 4℃，600g 离心 10 分钟，弃去上层血浆用 3 倍体积的 PBS 清洗 3 次（用 PBS 重悬血细胞，600g 离心 10 分钟），加入等体积试剂一，混匀后 4℃放置 10 分钟，8000g 离心 10 分钟，吸取上清放于 4℃待测，若暂时不能完成测试可放于-80℃保存（可保存 10 天）。

（3）细胞处理

收集不少于 500 万个细胞，首先用 PBS 清洗细胞 2 次（PBS 重悬细胞，600g 离心 10 分钟），加入 1mL 试剂一重悬细胞，反复冻融 2-3 次（可在液氮中冻结，37℃水浴中溶解）或者进行超声（200W，超 3s，停 10s，重复 30 次），8000g 离心 10 分钟，收集上清于 4℃待测，若暂时不能完成测试可放于-80℃保存（可保存 10 天）。

二、测定步骤

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 412nm，分光光度计蒸馏水调零。

2、试剂二放置 37℃（哺乳动物）或 25℃（一般物种）水浴中保温 30min。

3、标准品的稀释：取适当溶液配制浓度为 125μg/mL、62.5μg/mL、31.25μg/mL、15.625μg/mL、7.8125μg/mL、3.90625μg/mL、0μg/mL 的标准品（试剂一十倍稀释后进行稀释）。

4、取 0.5mL 离心管，加入 20μL 稀释好的标准品或样本，加入 1μL 试剂二，混匀后 37℃孵育 30 分钟。

5、制作标准曲线

孵育完成后标准管（0μg/mL 为空白管）依次加入 140μL 试剂三，20μL 试剂四，20μL 试剂五，2μL 试剂六（加入试剂六即开始计时），迅速混匀后，测定 412nm 处 30s 和 150s 光吸收 A1 和 A2，计算 $\Delta A_{标准} = A2 - A1$ 。以吸光度（ $\Delta A_{标准} - \Delta A_{空白}$ ）为横坐标（x），浓度为纵坐标（y）做标准曲线。

6、样本管依次加入 140μL 试剂三，20μL 试剂四，20μL 试剂五，2μL 试剂六（加入试剂六即开始计时），迅速混匀后，测定 412nm 处 30s 和 150s 光吸收 A1 和 A2， $\Delta A_{测定} = A2 - A1$ 。

三、GSSG含量计算

根据标准曲线，将样本（ $\Delta A_{测定} - \Delta A_{空白}$ ）带入公式中（x），计算出样本浓度 y（μg/mL）。

（1）按蛋白浓度计算

$$GSSG (\mu g/mg \text{ prot}) = y \times V_{样} \div (V_{样} \times C_{pr}) = y \div C_{pr}$$

（2）按样本质量计算

$$GSSG (\mu g/g \text{ 质量}) = y \times V_{样} \div (V_{样} \div V_{样总} \times W) = y \div W$$

（3）按细胞数量计算

$$\text{GSSG} (\mu\text{g}/10^6 \text{ cell}) = y \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) = y \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

$$\text{GSSG} (\mu\text{g}/\text{mL}) = 2y$$

V 样总: 上清液总体积, 1mL; V 样: 加入反应体系中上清液体积, 20 μ L=0.02mL; W: 样本质量, g; Cpr: 上清液蛋白质浓度, mg/mL; 细胞数量: 以 10⁶ 单位计量; 2: 血浆 (血细胞) 稀释一倍。

注意事项:

- 1、样本处理需匀浆完全, 若当天不能完成测量, 可放-80 $^{\circ}$ C保存。
- 2、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。
- 3、此方法利用酶促反应速率计算底物浓度, 尽量准确在 30 秒和 150 秒处完成读数。
- 4、如果测定吸光值超过线性范围吸光值, 可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。
- 5、如果样本量过多, 可将试剂三与试剂六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。
- 6、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。

相关发表文献:

- [1] Ming Song, Fangfang Chen, Yihui Li, et al. rimetazidine restores the positive adaptation to exercise training by mitigating statin-induced skeletal muscle injury. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. November 2017; (IF10.754)
- [2] Hua Li, Lanying Wang, Yanping Luo. Composition Analysis by UPLC-PDA-ESI (-)-HRMS and Antioxidant Activity Using *Saccharomyces cerevisiae* Model of Herbal Teas and Green Teas from Hainan. *Molecules*. October 2018; (IF3.06)

参考文献:

- [1] Alpert A J, Gilbert H F. Detection of oxidized and reduced glutathione with a recycling postcolumn reaction[J]. *Analytical biochemistry*, 1985, 144(2): 553-562.
- [2] Owens C W I, Belcher R V. A colorimetric micro-method for the determination of glutathione[J]. *Biochemical Journal*, 1965, 94(3): 705.