

氧化型谷胱甘肽(GSSG)含量检测试剂盒

Oxidized Glutathione Assay Kit

微量法

货号: AK221

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK221-A	100mL×1 瓶	4℃保存
AK221-B	130μl×1 支	4℃保存
AK221-C	20mL×1 瓶	4℃保存
AK221-D	2.5mL×1 瓶	4℃保存
AK221-E	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加入 2.5 mL 蒸馏水, 溶解后-20℃分装保存
AK221-F	液体 12.5μl×1 瓶	4℃保存; 临用前根据用量将其与蒸馏水按 1:20 (V:V) 的比例配制备用, 现用现配
AK221-标准品	粉剂×1 瓶	4℃保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 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。

原理: 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将 GSSG 还原为 GSH, 借此测定氧化型谷胱甘肽的含量。

自备用品:

天平、研钵或匀浆器、可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅、微量玻璃比色皿/96 孔板、蒸馏水。

粗酶液提取:

1. 组织: 新鲜组织先用 PBS 冲洗 2 次, 然后称取动物组织或者植物组织 0.1g, 放入用 AK221-A 润洗过的匀浆器中 (匀浆器提前放冰上预冷); 然后加入 1ml AK221-A (组织/AK221-A 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. 细胞: 收集不少于 500 万个细胞, 先用 PBS 清洗细胞 2 次 (PBS 重悬细胞, 600g 离心 10 分钟), 加入 1ml AK221-A 重悬细胞, 反复冻融 2-3 次 (可在液氮中冻结, 37℃水浴中溶解), 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)。
3. 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 AK221-A, 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 AK221-A，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）。

测定步骤：

1. 分光光度计或酶标仪预热 30min，调节波长到 412nm，蒸馏水调零。
2. AK221-B 置于 25℃（一般物种）或者 37℃（哺乳动物）水浴中保温 30min。
3. 标准品的稀释：将标准品用 1ml 蒸馏水溶解，浓度为 10mg/ml；再取适当溶液配制浓度为 125µg/ml、62.5µg/ml、31.25µg/ml、15.625µg/ml、7.8µg/ml、3.9µg/ml、0µg/ml 的标准品（用 AK221-A 十倍稀释后进行稀释）。
4. 按下表依次加入下列试剂：

试剂名称	标准管(ul)	测定管 (ul)
标准液	20	
样品		20
AK221-B	1	1
盖紧后混匀，置于 37℃水浴 30min；开盖后依次加入		
AK221-C	140	140
AK221-D	20	20
AK221-E	20	20
AK221-F	2	2
迅速混匀后，测定 30s 和 150s 光吸收 A1 和 A2 (标准管) 和 A3 和 A4 (测定管)， ΔA 标准=A2-A1， ΔA 样品=A4-A3		

GSSG 含量计算公式：

以吸光度 ΔA 标准为横坐标 (x)，浓度为纵坐标 (y) 做标准曲线，然后根据标准曲线，将 ΔA 样品带入公式中 (x)，计算出样品浓度 y (µg/ml)。

1. 按蛋白浓度计算：

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

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit (C05-02001)

2. 按样本质量计算：

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

3. 按细胞数量计算

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

4. 按照液体体积计算

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

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

注意事项：

1. 因为 AK221-A 中含有蛋白质沉淀剂，因此上清液不能用于测定蛋白含量，需另行测定。
2. 若不确定样品中 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。