

氧化型谷胱甘肽（GSSG）检测试剂盒（分光光度法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

GSH/GSSG 是细胞内最重要的氧化还原对之一。因此，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。

测定原理：

利用 2-VP 法测 GSSG 含量。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 300μL×1 支，4℃ 保存。

试剂三：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂四：液体 6mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂五：液体 30μL×1 瓶，-20℃ 保存。临用前加入 0.6 mL 试剂三稀释，4℃ 保存。

试剂六：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加入 40 mL 试剂三溶解，现配现用。

粗酶液提取：

- 1. 组织：**按照组织质量（g）：试剂一体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10min，取上清液（如上清不清澈，再离心 3min）待测。
- 2. 细菌、真菌：**按照细胞数量（ 10^4 个）：试剂一体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；8000g 4℃ 离心 10min，取上清液（如上清不清澈，再离心 3min）的蒸馏水混匀待测。
- 3. 血清等液体：**直接测定。

测定步骤：

1. 分光光度计预热 30 min，调节波长到 412 nm，蒸馏水调零。
2. 试剂三置于 25℃（一般物种）或者 37℃（哺乳动物）水浴中保温 30min。
3. **测定管：**取 1 mL EP 管，加入 100 μL 上清液，5μL 试剂二，盖紧后混匀，置于 37℃ 水浴 30min；依次加入 100 μL 试剂四，10 μL 试剂五，700 μL 试剂六，迅速混匀后，立即测定 30 s 和 150 s 光吸收 A1 和 A2，计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

GSSG 含量计算公式:

1、标准条件下测定的回归方程为 $y=0.0276x-0.0011$; x 为标准品浓度 (nmol/mL), y 为吸光值(ΔA)。

2、按蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{GSSG (nmol/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0011) \div 0.0276 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \\ &= 36.23 \times (\Delta A + 0.0011) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算

$$\begin{aligned} \text{GSSG (nmol/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0011) \div 0.0276 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \\ &= 36.23 \times (\Delta A + 0.0011) \div W \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{GSSG (nmol/10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A + 0.0011) \div 0.0276 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \\ &= 36.23 \times (\Delta A + 0.0011) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

5、按照液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{GSSG (nmol/mL)} &= (\Delta A + 0.0011) \div 0.0276 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \\ &= 36.23 \times (\Delta A + 0.0011) \end{aligned}$$

$V_{\text{样}}$: 反应中加入样本体积, 0.1mL;

$V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL;

W : 样品质量, g,

C_{pr} : 样本蛋白浓度 (mg/mL)

注意事项:

1. 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。
2. 临用前配制的试剂配好后 4℃ 保存, 2 天内使用完毕。
3. 最低检出限为 0.1 μ mol/L。
4. 反应温度.严格来说, 为保证重复性, 应在 25℃ 下进行反应。
5. 反应时间需精确控制, 否则会影响反应速率计算, 产生较大误差。
6. 样品中的 GSSG 浓度尽可能低一些, 否则反应速率太大, 没法控制, 所以稀释倍数要尽量大些。