

氧化型谷胱甘肽含量测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

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。

自备仪器和用品：

低温离心机、水浴锅、可调节移液器、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 600 μL×1 支，4℃ 保存。

试剂三：液体 30mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂四：液体 2.5mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂五：液体 15 μL×1 瓶，-20℃ 保存。临用前加入 0.3mL 试剂三稀释，4℃ 保存。

试剂六：粉剂×2 瓶，4℃ 保存。临用前每瓶加入 10 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 (10⁴ 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）混匀待测。
3. 血清等液体：直接测定。

GSSG 含量测定：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长到 412nm。
2. 参照试剂的组成和配制，配好试剂五和试剂六。
3. 将试剂四、五、六于 37℃ 水浴 10 分钟。
4. 取 1 mL EP 管，加入 100 μL 上清液，5 μL 试剂二，盖紧后混匀，得混合液，置于 37℃ 水浴 30min；取 21 μL 混合液于 96 孔板，然后依次加入 20 μL 试剂四、2 μL 试剂五和 140 μL 试剂六，迅速混匀后，测定 30 s 和 150 s 光吸收 A1 和 A2，计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

注意：临用前可以把试剂四和试剂五按照比例配成混合液，加入 20 μL 试剂四和 2 μL 试剂五时替换为 22 μL 混合液。

GSSG 含量计算公式：

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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

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

$$=36.23 \times (\Delta A + 0.0011) \div \text{Cpr}$$

3、按样本鲜重计算

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

$$=36.23 \times (\Delta A + 0.0011) \div W$$

4、按细胞数量计算

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

$$=36.23 \times (\Delta A + 0.0011) \div \text{细胞数量}$$

5、按照液体体积计算

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

$$=36.23 \times (\Delta A + 0.0011)$$

V 样：反应中加入样本体积，20 μ L；V 样总：加入提取液体积，1mL；W：样品质量，g，

Cpr：样本蛋白浓度（mg/mL）

b.使用 96 孔板测定的计算公式如下

1、标准条件下测定的回归方程为 $y=0.0138x-0.0011$ ；x 为标准品浓度（nmol/mL），y 为吸光值（ ΔA ）。

2、按蛋白浓度计算

$$\text{GSSG (nmol/mg prot)} = (\Delta A + 0.0011) \div 0.0138 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr})$$

$$=72.46 \times (\Delta A + 0.0011) \div \text{Cpr}$$

3、按样本鲜重计算

$$\text{GSSG (nmol/g 鲜重)} = (\Delta A + 0.0011) \div 0.0138 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W)$$

$$=72.46 \times (\Delta A + 0.0011) \div W$$

4、按细胞数量计算

$$\text{GSSG (nmol/10}^4 \text{ cell)} = (\Delta A + 0.0011) \div 0.0138 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量})$$

$$=72.46 \times (\Delta A + 0.0011) \div \text{细胞数量}$$

5、按照液体体积计算

$$\text{GSSG (nmol/mL)} = (\Delta A + 0.0011) \div 0.0138 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}}$$

$$=72.46 \times (\Delta A + 0.0011)$$

V 样：反应中加入样本体积，20 μ L；V 样总：加入提取液体积，1mL；W：样品质量，g，

Cpr：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。