

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。

试剂组成和配置：

试剂一：液体100mL×1瓶，4°C保存。

试剂二：液体600 μ L×1支，4°C保存。

试剂三：液体50mL×1瓶，4°C保存。

试剂四：液体2.5mL×1瓶，4°C保存。

试剂五：液体15 μ L×1瓶，-20°C保存。临用前加入0.3mL试剂三稀释，4°C保存。

试剂六：粉剂×1瓶，4°C保存。临用前加入20 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°C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°C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，蒸馏水调零。
2. 试剂三置于25°C（一般物种）或者37°C（哺乳动物）水浴中保温30min。
3. 取1 mL EP管，加入100 μ L上清液，5 μ L试剂二，盖紧后混匀，得混合液，置于37°C水浴30min；取21 μ L混合液于96孔板，然后依次加入20 μ L试剂四、2 μ L试剂五和140 μ L试剂六，迅速混匀后，测定30 s和150 s光吸收A1和A2，计算 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

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

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

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

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

$$\text{GSSG (nmol/104 cell)} = (\Delta A + 0.0011) \div 0.0276 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量})$$

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

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

$$\text{GSSG (nmol/104 cell)} = (\Delta A + 0.0011) \div 0.0138 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量})$$

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

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 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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。

