

氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 检测试剂盒 (微量法)

货号 : PMK1024

保存 : -20°C 避光保存 12 个月

规格 : 48T/48S 96T/96S

检测范围: 0.313μM-20μM 灵敏度: 0.313μM

适用样本: 动植物组织、细胞、血细胞、细菌、血清 (浆) 或其他液体

产品简介

谷胱甘肽有还原型 (GSH) 和氧化型 (GSSG) 两种形态, 氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 是谷胱甘肽的氧化形式, 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, 也是谷胱甘肽氧化还原循环的主要指标之一。本试剂盒提供了一种简单的检测方法检测各种生物样本中 GSSG 的含量。还原型谷胱甘肽能和 5,5'-二硫代-双-(2-硝基苯甲酸) (5, 5'-dithiobis- 2-nitrobenzoic acid, DTNB) 反应生成 2-硝基-5-巯基苯甲酸, 在波长 412nm 处具有最大光吸收, 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 (Glutathione reductase, GR) 将 GSSG 还原为 GSH, 借此测定氧化型谷胱甘肽的含量。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液	50mL	100mL	4°C
反应缓冲液	10mL	20mL	4°C
试剂一	300 μL	600 μL	-20°C 避光保存
试剂二	10 μL	20 μL	4°C 避光保存
试剂三	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	-20°C 避光保存
试剂四	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	4°C 避光保存
标准品	粉剂×1 支	粉剂×1 支	4°C 避光保存

自备耗材

酶标仪或可见光分光光度计 (能测 412nm 处的吸光度) 及恒温箱

96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头

制冰机、低温离心机、去离子水、匀浆器 (如果是组织样本)

试剂准备

注意: 各组分 (小管试剂) 开盖前, 请先低速离心。

提取液: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4°C 保存。

反应缓冲液: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4°C 保存。

试剂一: 即用型; 使用前, 避光平衡到室温; -20°C 避光保存。

试剂二稀释液: 使用时, 按取试剂二 6μL 加水 0.12mL 的比例配制, 整个实验过程中, 冰上避光放置。现用现配, 用多少配多少; 4°C 避光保存。

试剂三: 使用前 96T 加 2.5mL 水, 48T 加 1.25mL 水溶解; 分装-20°C 避光保存。

试剂四: 使用前 96T 加 2.5mL 水, 48T 加 1.25mL 水溶解; 4°C 避光保存。

产品说明书

标准品制备：

稀释提取液：按 1:10 的比例用去离子水稀释提取液，如：取 250 μL 提取液加入 2,250 μL 去离子水。

20mM GSSG 标准品：取 1 管标准品，用 1mL 稀释后的提取液溶解得 20mM GSSG 标准品；4°C 避光保存。

20 μM GSSG 标准品：取 1 μL 20mM GSSG 标准品用 999 μL 稀释后的提取液稀释，使用 20 μM GSSG 标准品，按照下表所示，进一步稀释标准品：

	标准品体积 (μL)	稀释后的提取液体积 (μL)	标准品浓度 (μM)
Std. 1	200	0	20
Std. 2	100 μL of Std. 1	100	10
Std. 3	100 μL of Std. 2	100	5
Std. 4	100 μL of Std. 3	100	2.5
Std. 5	100 μL of Std. 4	100	1.25
Std. 6	100 μL of Std. 5	100	0.625
Std. 7	100 μL of Std. 6	100	0.313

注意：每次实验都要做一次标准品检测，制作标曲；稀释后的标准品溶液不稳定，必须在 4 小时内使用。

样本制备

动物组织：称取 0.1g 组织样本，加入 1mL 预冷的提取液，快速冰上匀浆。匀浆后的样本，8,000 g，4°C 离心 10min，取上清液，置冰上待测。

植物组织：称取 0.1g 植物组织剪碎，加入 1mL 预冷的提取液，快速冰上匀浆。匀浆后的样本冰浴超声波破碎 5min（功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次）。超声后的样本，8,000g，4°C 离心 10min，取上清液，置冰上待测。

血清或血浆：按常规方法收集血清，加入等体积的提取液，4°C，8,000g 离心 10min，取上清液，置冰上待测。将收集的抗凝血于 4°C，600g 离心 10min，30min 内吸取上层血浆到另一支试管中，加入等体积的提取液，4°C，8,000g 离心 10min，取上清液，置冰上待测。

血细胞：将收集的抗凝血于 4°C，600g 离心 10min，弃去上层血浆，用 PBS 重悬，收集 5×10^6 个血细胞，用冷 PBS 清洗 2 次（用 PBS 重悬血细胞，4°C 600g 离心 10min），加入 1mL 预冷的提取液，冰浴超声波破碎 5min（功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次）。超声后的样本，8,000g，4°C 离心 10min，取上清液，置冰上待测。

细胞或细菌：收集 5×10^6 个细胞或细菌，首先用冷 PBS 清洗细胞 2 次（用 PBS 重悬细胞，4°C 600g 离心 10min），加入 1mL 预冷的提取液重悬细胞或细菌，冰浴超声波破碎 5min（功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次）。超声后的样本，8,000g，4°C 离心 10min，取上清液，置冰上待测。

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80°C 保存 1 个月。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。

实验步骤

1. 酶标仪或可见光分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 412nm，可见光分光光度计去离子水调零。
2. 试剂二稀释液、试剂三和试剂四 37°C 保温 10min。
3. 在 EP 管中按照如下方式加样：

试剂 (μL)	空白	标准	测定
去离子水	0	0	90
稀释后的提取液	100	0	0
标准品	0	100	0
样本	0	0	10
试剂一	5	5	5

产品说明书

混匀, 37℃孵育 30min, 取 21μL 混合液于微量玻璃比色皿或 96 孔板中

混合液	21	21	21
反应缓冲液	140	140	140
试剂二稀释液	2	2	2
试剂三	20	20	20
试剂四	20	20	20

4. 充分混匀, 37℃避光孵育 10min, 记录 10min 时的吸光度 $A_{\text{空}}$ 、 $A_{\text{标}}$ 、 $A_{\text{测}}$ 。计算 $\Delta A_{\text{测}}=A_{\text{测}}-A_{\text{空}}$, $\Delta A_{\text{标}}=A_{\text{标}}-A_{\text{空}}$ (空白管只需做 1 管)。

注意: 1. 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 $\Delta A_{\text{测}}$ 小于 0.005 可适当加大样本量。如果 $\Delta A_{\text{测}}$ 大于 2.0, 样本可用去离子水进一步稀释, 计算结果乘以最终稀释倍数。

2. 如果样本量过多, 可将反应缓冲液、试剂二稀释液与试剂三按照比例混匀配成工作液加入。

结果计算

1. 标准曲线的绘制

以标准品浓度为 y 轴, $\Delta A_{\text{标}}$ 为 x 轴, 绘制标准曲线 (浓度为 y 轴更方便计算结果)。

2. 含量计算

将 $\Delta A_{\text{测}}$ 带入方程得到 y 值 ($1\mu\text{M}=1\text{nmol/mL}$)。

(1) 按样本鲜重计算

$$\text{GSSG (nmol/g 鲜重)} = y \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times 10 \times n = 10y \div W \times n$$

(2) 按液体样本体积计算

$$\text{GSSG (nmol/mL)} = 2 \times y \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \times 10 \times n = 20y \times n$$

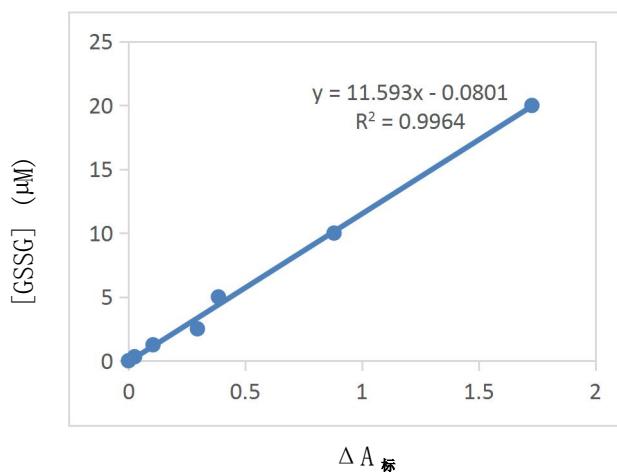
(3) 按细胞数目计算

$$\text{GSSG (nmol/10}^4 \text{ cells)} = y \times V_{\text{样}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times 10 \times n = 0.02y \times n$$

$V_{\text{样}}$: 反应中加入样本体积, 0.002mL, 根据比例折算 $10\mu\text{L} \times (21 \div 105) = 2\mu\text{L}$; W : 样本质量, g; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; 10: 样本检测时的稀释倍数, $(10+90) \div 10$; 2: 液体样本制备时的稀释倍数, 加入等体积的提取液即稀释 2 倍; n: 样本进一步稀释的稀释倍数; 500: 细胞数量, 500 万。

结果展示

典型标准曲线-以下数据和曲线仅供参考, 实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家规定进行实验, 尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究, 如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途, 我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用, 并请严格按照说明书进行存储。

产品说明书

4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

- PMK1023 还原型谷胱甘肽（GSH）检测试剂盒（微量法）
- PMK1879 GSH 和 GSSG 检测试剂盒（微量法）
- PMK1022 谷胱甘肽还原酶（GR）检测试剂盒（微量法）
- PMK1027 谷胱甘肽 S-转移酶（GST）检测试剂盒（微量法）
- PMK1025 谷胱甘肽过氧化物酶（GPX）检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

