氧化型谷胱甘肽（GSSG）含量检测试剂盒说明书

规格：96 样　　方法：酶标仪法

一、注意事项

1. 使用前请通读一遍说明书再开始实验。
2. 正式检测前选取 2~3 个样本进行预检测。
3. 本试剂盒仅用于科研。
4. 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。
5. 本提取液含有蛋白沉淀成分，所得上清液不可用于蛋白质浓度测定。
6. 临用前配制的试剂应于 4°C 避光保存，并在 2 日内使用完毕。
7. 本方法的最低检出限为 0.1 μmol/L。
8. 反应时间需严格精确控制，否则将影响反应速率的计算，引入较大系统误差。
9. 若不确定样本中 GSSG 含量的高低，可用试剂一稀释几个梯度后再进行测定，以确保测定结果处于标准曲线可靠区间。
10. 样本采集过程中，GSSG 的代谢速率较快，为确保测定准确性，在完成样本收集后，建议尽快使用试剂一对样本进行处理。

二、产品组分

试剂名称	试剂规格	保存条件	备注
试剂一	100 mL×1	4℃	
试剂二	600 μL×1	4℃	
试剂三	30 mL×1	4℃	
试剂四	2.5 mL×1	4℃	
试剂五	15 μL×1	-20℃	临用前加入 0.3 mL 试剂三稀释，4℃保存
试剂六	粉剂×2	4℃	临用前每瓶加入 10 mL 试剂三溶解，现配现用

三、仪器和用品

酶标仪、96 孔板、移液器、天平、可降温离心机、超纯水/蒸馏水、研磨仪/研钵、冰、水浴锅。

四、样品制备

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 0.1 g 组织，加入 1 mL 试剂一）进行冰浴匀浆。8000 g，4℃离心 10 min，取上清液（如上清不清澈，再离心 3 min）待测。

2. 细菌/细胞：按照细菌/细胞数量（10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌/细胞加入 1 mL 试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率 300 w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3 min）；8000 g，4℃离心 10 min，取上清液（如上清不清澈，再离心 3 min）混匀待测。

3. 液体样本：直接测定，若有浑浊则离心后取上清使用。

五、测定步骤

1. 酶标仪预热 30 min 以上，波长调至 412 nm 处。

2. 将试剂四、五、六于 37℃水浴 10 min。

3. 在 1.5 mL 离心管中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	对照管
上清液	100	-
试剂二	5	5
混匀，置于 37℃水浴 30 min，取 21 μL 混合液于 **96 孔板**，依次加入以下试剂。		
试剂四	20	20
试剂五	2	2
试剂六	140	140
蒸馏水	-	100
迅速混匀后，测定 30 s 和 150 s 光吸收 A1 和 A2，计算ΔA 测定=A2 测定-A1 测定；ΔA 对照=A2 对照-A1 对照；ΔA=ΔA 测定-ΔA 对照。		

六、计算

1. 标准方程：

标准条件下测得回归方程为：y=0.0138x-0.0011，R^2=0.9989；x 为标准品浓度（nmol//mL），y 为吸光值ΔA。

2. 按样本鲜重计算

氧化型谷胱甘肽（nmo/g 鲜重）=（ΔA+0.0011）÷0.0138×V 样÷（V 样÷V 样总×W）=72.46×（ΔA+0.0011）÷W

3. 按照蛋白浓度计算

氧化型谷胱甘肽（nmol/mg prot）=（ΔA+0.0011）÷0.0138×V 样÷（V 样×Cpr）=72.46×（ΔA+0.0011）÷Cpr

4. 按照液体样本体积计算

氧化型谷胱甘肽（nmol/mL）=（ΔA+0.0011）÷0.0138×V 样÷V 样=72.46×（ΔA+0.0011）

5. 按细菌/细胞数量计算

氧化型谷胱甘肽（nmol/10^4 cell）=（ΔA+0.0011）÷0.0138×V 样÷（V 样÷V 样总×N）=72.46×（ΔA+0.0011）÷N

V 样：反应中加入样本体积，20 μL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；W：样品质量，g，Cpr：样本蛋白浓度（mg/mL）；N：细胞/细菌总数，（万个）。

七、产品简介

氧化型谷胱甘肽（GSSG）是谷胱甘肽的氧化形式，由两分子还原型谷胱甘肽（GSH）通过二硫键连接而成，广泛存在于动植物及微生物细胞中。主要功能是作为细胞氧化还原平衡的重要组成，参与清除过氧化物及维持蛋白质巯基稳态，其含量变化可反映细胞氧化应激水平，是评价机体抗氧化状态及活性氧代谢的重要指标。