**组织细胞氧化型谷胱甘肽GSSG含量测定试剂盒**

**Oxidized Glutathione Assay Kit**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **产品编号** | **产品名称** | **规格** |
| E2073 | Oxidized Glutathione Assay Kit | 100T |

**产品简介**

氧化型谷胱甘肽检测试剂盒（Oxidized Glutathione Assay Kit）是一种灵敏的检测氧化型谷胱甘肽的试剂盒。谷胱甘肽包括还原型谷胱甘肽（GSH）和氧化型谷胱甘肽（GSSG）。GSH 是细胞中巯基的主要来源，对于维护蛋白巯基适当的氧化还原状态有重要作用，动物细胞中谷胱甘肽主要是GSH，但是在氧化应激条件下GSH会被氧化为GSSG。

GSH可以和DTNB反应生成黄色的TNB和GSSG，利用该反应可以通过测定生成的TNB在412nm波长的吸光度定量检测GSH；另外谷胱甘肽还原酶(Glutathione Reductase, GR)可以将GSSG还原为GSH，在反应体系中增加GR，可以测定总谷胱甘肽，并能通过酶反应将GSSG反复还原为GSH，从而极大提高GSH和DTNB显色反应对总谷胱甘肽检测的灵敏度。

本试剂盒首先利用GSH掩蔽剂(Masking Reagent)清除样品中的GSH，然后利用然后利用上述酶循环反应检测样品中GSSG的浓度。

本试剂盒检测GSSG的线性范围为0.156-5 μM，灵敏度≤0.156 μM。

本试剂盒能够检测动物细胞和组织中的GSSG。

**试剂盒组成**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **组份编号** | **组份名称** | **规格** | **数量** | **储存** |
| E2073-1 | Glutathione Assay Buffer | 100 ml/瓶 | 1 | -20℃ |
| E2073-2 | DTNB Solution | 120 μl/管 | 1 | -20℃ |
| E2073-3 | NADPH Solution | 120 μl/管 | 1 | -80℃ |
| E2073-4 | Glutathione Reductase | 120 μl/管 | 1 | -20℃ |
| E2073-5 | GSSG Standard (0.5 mM) | 100 μl/管 | 1 | -20℃ |
| E2073-6 | Masking Reagent | 120 μl/管 | 1 | -20℃ |
| E2073-7 | Sulfosalicylic Acid | 1 g/管 | 1 | -20℃ |
| ─ | 说明书 | 份 | 1 |  |

**需要而未提供的试剂及器材**

1. 纯水
2. Triton X-100
3. 系列可调节量程移液器及吸头
4. 离心管及96孔板
5. 酶标仪

**储存条件**

干冰运输，收到试剂盒后将试剂盒不同组分按上述温度储存，有效期12个月。蛋白沉淀试剂Sulfosalicylic Acid (SSA)配制成溶液后4℃储存，储存时间不超过24小时。

**注意事项**

1. 本试剂盒检测涉及氧化还原反应，很多氧化剂和还原剂都会干扰试剂盒的测定，特别是巯基乙醇、DTT等含有巯基的试剂会严重干扰本试剂盒的测定，请尽量避免。
2. 在每次测定同时利用标准品制作标准曲线，样品中谷胱甘肽浓度过低时，可适当延长反应时间。
3. NADPH在溶液中容易分解，要严格按储存条件保存。
4. 初次使用试剂盒时，小体积液体试剂请适当离心后使用。
5. 本产品仅限专业人员用于科学研究，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。
6. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

**测定前准备**

**1. 蛋白沉淀试剂的准备**

利用纯水将Sulfosalicylic Acid (SSA)溶解配制为5%的溶液作为蛋白沉淀试剂，另外利用Glutathione Assay Buffer将5% SSA稀释为0.5%浓度溶液作为样品和标准品稀释液，室温保存不超过24小时。

**2. 样品的准备**

* 1. 细胞裂解上清的准备：将需要测定的细胞(1×106-1×107)收集到1.5 ml的离心管中，4℃、300 g离心5分钟，弃去上清，然后加入200 μl含0.1%Triton X-100的Glutathione Assay Buffer，冰浴裂解30分钟，4℃、10000 g离心10分钟，收集上清（如需测定蛋白浓度用于后续校准，取此上清液进行蛋白定量）。取部分上清到新的1.5 ml离心管中，加入等体积的5% SSA，振荡混匀后冰浴5分钟，4℃、10000 g离心5分钟，收集上清，利用Glutathione Assay Buffer将上清稀释5倍至SSA浓度为0.5%。
	2. 组织裂解上清的准备：将需要测定的组织(20-50 mg)收集到玻璃匀浆器或自动匀浆管中，然后加入500 μl含0.1%Triton X-100的Glutathione Assay Buffer，匀浆1分钟，将匀浆液转移到1.5 ml离心管中，4℃、10000 g离心10分钟，收集上清（如需测定蛋白浓度用于后续校准，取此上清液进行蛋白定量）。取部分组织裂解上清到新的1.5 ml离心管中，加入等体积的5% SSA，振荡混匀后冰浴5分钟，4℃、10000 g离心5分钟，收集上清，利用Glutathione Assay Buffer将上清稀释5倍至SSA浓度为0.5%。

注：各种样品，如果不立即进行测定，请冻存于-80℃；正式测定前根据预实验结果，可以进一步利用含0.5% SSA的Glutathione Assay Buffer将含高浓度谷胱甘肽样品适当稀释后进行测定。

**3. 标准品的准备**

GSSG标准品的准备：在1.5 ml离心管中，加入990 μl含0.5% SSA的Glutathione Assay Buffer，取10 μl的0.5 mM浓度的GSSG Standard加入离心管中配制5 μM浓度的GSSG Standard；另外取5根1.5 ml离心管，分别加入200 μl含0.5% SSA的Glutathione Assay Buffer，再吸取200 μl的5 μM浓度GSSG Standard依次倍倍稀释为2.5、1.25、0.625、0.312、0.156 μM浓度。

**4. Masking Reagent的准备**

利用Glutathione Assay Buffer将Masking Reagent稀释25倍。

**5. 检测工作液的准备**

谷胱甘肽检测工作液的配制：根据待测样品数参考下表比例配制适量的谷胱甘肽检测工作液，表中试剂按比例混合后即为谷胱甘肽检测工作液。

注意：谷胱甘肽检测工作液现用现配，并立即使用。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 1个样品 | 10个样品 | 100个样品 |
| Glutathione Assay Buffer | 47 μl | 470 μl | 4.7 ml |
| DTNB Solution | 1 μl | 10 μl | 100 μl |
| NADPH | 1 μl | 10 μl | 100 μl |
| Glutathione Reductase | 1 μl | 10 μl | 100 μl |

**测定方法**

1. 在96孔板中设置空白对照孔、标准品孔和样品孔，如下表所示，在空白对照孔中加入25 μl含0.5% SSA的Glutathione Assay Buffer，在标准品孔中加入25 μl梯度浓度GSSG Standard (0.156-5 μM)，在样品孔中加入25 μl样品；然后各孔加入25 μl稀释后的Masking Reagent，37℃孵育1小时。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 　 | 空白对照孔 | 标准品孔 | 样品孔 |
| 0.5% SSA的Glutathione Assay Buffer | 25 μl | ─ | ─ |
| GSSG Standard  | ─ | 25 μl | ─ |
| 样品 | ─ | ─ | 25 μl |
| Masking Reagent | 25 μl | 25 μl | 25 μl |
| 37℃孵育 | 1 h | 1 h | 1 h |
| 谷胱甘肽检测工作液 | 50 μl | 50 μl | 50 μl |
| 25℃孵育 | 20 min | 20 min | 20 min |

1. 各孔按上表加入50 μl谷胱甘肽检测工作液，25℃孵育20分钟，每5分钟测定1次412nm吸光度值。

**数据处理**

利用GSSG Standard浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标制作标准曲线，然后利用样品测定中的吸光度值，计算样品的氧化型谷胱甘肽浓度。GSSG标曲测定如下图所示：



**结果计算**

GSSG**标准品拟合曲线：y = a1x+ b1**

**血清（浆）、细胞培养上清中GSSG 含量：**

GSSG含量（μmol/L）=（ΔA1 - b1）÷ a1 × 10\*\* × f

**动物组织中GSSG 含量：**

GSSG含量（μmol/g）=（ΔA1 - b1）÷ a1 ÷（m/ V1 ）× 10\*\*× f

GSSG含量（μmol//mg prot）=（ΔA1 - b1）÷ a1 × 10\*\* × f ÷Cpr

**培养细胞中GSSG 含量：**

GSSG含量（μmol/109）=（ΔA1 - b1）÷ a1 ÷（1\*\*\* /V2）× 10\*\*× f

GSSG含量（μmol//mg prot）=（ΔA1 - b1）÷ a1 × 10\*\* × f ÷Cpr

**注解:**

y：标准品OD值-空白OD值（标准品浓度为0时的OD值）

x：吸光度对应的浓度

ΔA1：样本测定OD值-空白OD值

a1：标曲斜率

b1：标曲截距

10\*\*：样本处理过程中，稀释了10倍

f：样本加入检测体系之前的稀释倍数

m：组织湿重g

V1：动物组织处理过程中加入裂解液的体积L

1\*\*\*：细胞处理时，细胞总数 1×106 个

V2：细胞处理过程中加入裂解液的体积L

Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/L

**参考文献**

1. Alisik M., Alisik T., Nacir B., Neselioglu S., Genc-Isik I., Koyuncu P., et al. Erythrocyte reduced/oxidized glutathione and serum thiol/disulfide homeostasis in patients with rheumatoid arthritis. Clin. Biochem. 2021; 94: 56-61.
2. Ngamchuea K., Batchelor-McAuley C., Compton R.G. Rapid method for the quantification of reduced and oxidized glutathione in human plasma and saliva. Anal. Chem. 2017; 89 (5): 2901-2908.