

改良型还原型/氧化谷胱甘肽 (GSH/GSSG) 含量检测试剂盒 (本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0702	改良型还原型/氧化谷胱甘肽 (GSH/GSSG) 含量检测试剂盒	100T

产品内容

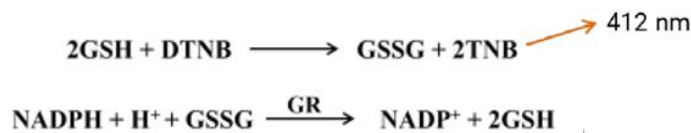
名称	规格	储存条件
酶 (GR) 溶液	>20U	-20℃
辅酶	>4mg	-20℃
底物 (DTNB)	>4mg	-20℃
GSH 标准样品	0.123mg	-20℃
GSSG 标准样品	0.123mg	-20℃
掩蔽剂	3.3mg	-20℃
淬灭剂	0.57mg	-20℃
蛋白去除剂	15mL	-20℃
缓冲液	30mL	-20℃

一、产品说明

谷胱甘肽 (Glutathione) 是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸组成的三肽, 在许多生物过程中发挥着关键作用, 包括蛋白质和 DNA 合成、氨基酸转运和氧化应激保护, 是保护细胞免受活性氧损伤的主要抗氧化剂之一。还原型谷胱甘肽(GSH)可将细胞质蛋白质中的二硫键还原为半胱氨酸, 而还原型谷胱甘肽转化为氧化型谷胱甘肽(GSSG)。

氧化型/还原型谷胱甘肽检测试剂盒是基于 GSH、5,5-二硫代-双-(2-硝基苯甲酸)(5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, DTNB)和谷胱甘肽还原酶(GR) 之间的酶促循环反应, 可准确检测生物样本中的总谷胱甘肽、还原型谷胱甘肽(GSH)和氧化型谷胱甘肽(GSSG)含量。检测原理为 DTNB 与还原型谷胱甘肽(GSH)反应生成黄色 2-硝基-5-巯基苯甲酸(TNB),在 412 nm 处的吸光度与样品中的谷胱甘肽浓度成正比。通过使用掩蔽剂来封闭 GSH,本试剂盒还可用于检测氧化型谷胱甘肽(GSSG)。该检测方法不受其它含巯基的生物分子干扰, 能够特异性检测 GSH 和 GSSG,试剂盒的线性检测范围宽 (0.1-3uM GSH), 检测下限低 (~10nM GSH)。

检测原理如下



翼飞雪氧化型/还原型谷胱甘肽检测试剂盒适用于定量检测全血、血浆、血清、尿液以及组织和细胞提取物中的还原型和氧化型谷胱甘肽(GSH/GSSG)。100T 至少可以检测 100 个样品。

二、试剂准备

- 1、底物工作液: 每管底物 (DTNB) 用 264 μ L DMSO (自备) 溶解配制成底物储备液 (25 $\times$)。用缓冲液稀释 25 倍即可获得底物工作液。每个样品或标样需 60 μ L 底物工作液, 可根据样品数量制备适当体积的底物工作液。(注: A. 底物工作液不稳定, 需现配现用。96 孔板每孔需 60 μ L 底物工作液。 B. 储备液-20 $^{\circ}$ C 可以存 2 个月, 避免反复冻融)
- 2、酶/辅酶工作液: 每管酶加入 1.1mL 试剂盒缓冲液, 充分溶解配制成酶工作液; 每管辅酶加入 1.1mL 试剂盒缓冲液, 充分溶解配制成辅酶工作液; 将酶工作液与辅酶工作液转移至 15mL 离心管中混合, 再加入 4.4 mL 试剂盒缓冲液配制成酶/辅酶工作液。每个样品或标样需 60 μ L 酶/辅酶工作液, 可根据样品数量制备适当体积的酶/辅酶工作液。(注: A. 酶/辅酶工作液不稳定, 需现配现用。 B. 工作液与辅酶工作液未混合前, -20 $^{\circ}$ C 可保存 2 个月)
- 3、GSH 标准溶液: 每管 GSH 标准样品中加入 1mL 蛋白去除剂, 配置成 400 μ M 的 GSH 标准液。(注: GSH 标准溶液 -20 $^{\circ}$ C 可保存 2 个月)
- 4、GSSG 标准溶液: 每管 GSG 标准样品中加入 1mL 蛋白去除剂, 配置成 200 μ M 的 GSSG 标准液。(注: GSSG 标准溶液 -20 $^{\circ}$ C 可保存 2 个月)
- 5、掩蔽剂: 每管掩蔽剂中加入 2.2mL 试剂盒缓冲液, 配置成掩蔽剂储液。(注: A. 由于掩蔽剂溶解度的原因, 配制此溶液时需剧烈涡旋震荡。 B. 掩蔽剂储液 -20 $^{\circ}$ C 可保存 2 个月)
- 6、淬灭剂: 每管淬灭剂中加入 0.55mL 试剂盒缓冲液, 配置成淬灭剂储液。(注: 淬灭剂储液 -20 $^{\circ}$ C 可保存 2 个月)

三、样品制备

- 1、组织: 称取后迅速剪碎用液氮研磨成粉末, 按照 10mg 组织样品粉末加入 100 μ L 蛋白去除剂的比例, 充分混匀后用玻璃匀浆仪进行组织匀浆, 4 $^{\circ}$ C 孵育 10min, 4 $^{\circ}$ C 10000g 离心 10min, 取上清待测。(注: A. 样品立即用于检测可 4 $^{\circ}$ C 短暂保存, 短期内不进行检测可 -80 $^{\circ}$ C 储存, 但保存时间不建议超过 1 周。 B. 对于比较容易匀浆的组织, 可不需要液氮速冻, 直接匀浆。)
- 2、细胞: 收集细胞 (200-500 万个) 并用 PBS 洗涤一次, 加入 3-5 倍细胞沉淀体积的蛋白去除剂, 充分混匀后超声波裂解细胞, 4 $^{\circ}$ C 10000g 离心 10min, 取上清待测。(注: A. 尽量使用新鲜细胞进行测定, 因为冷冻细胞测定数据不准确。 B. 样品裂解后需立即转移至冰上, 以防 GSH 在空气中氧化成 GSSG。 C. 样品立即用于检测可 4 $^{\circ}$ C 短暂保存, 短期内不进行检测可 -80 $^{\circ}$ C 储存, 但保存时间不建议超过 1 周。)
- 3、红细胞/血浆: 取新鲜血液, 600g 离心 10min, 沉淀为红细胞, 上清为血浆。血浆可直接进行检测; 红细胞用 PBS 洗涤两次, 取 50 μ L 沉淀, 加入 50 μ L 蛋白去除剂, 4 $^{\circ}$ C 或冰浴充分混匀, 超声波裂解细胞, 4 $^{\circ}$ C 10000g 离心 10min, 取上清待测。

四、含量测定

4.1 样品中总谷胱甘肽 (GSH+GSSG) 含量的测定

- 1) GSH 标准样品的制备: 取 25 μ L 的 GSH 标准溶液 (400 μ M), 加入 175 μ L 蛋白去除剂, 充分混匀后即为 50 μ M GSH 标准品溶液。用蛋白去除剂梯度稀释 GSH 标准品溶液至终浓度为 50 μ M、25 μ M、12.5 μ M、6.25 μ M、3.13 μ M、1.57 μ M、0 μ M。上述不同浓度的 100 μ L GSH 标准样品, 分别加入 20 μ L 试剂盒缓冲液, 混匀。(注: 梯度稀释方法为: 100 μ L 上一浓度的标准样品溶液加入 100 μ L 蛋白去除剂)
- 2) 待测样品的准备: 取 25 μ L 待测样品, 加入 50 μ L 蛋白去除剂和 15 μ L 缓冲液, 涡旋混匀, 即为待测样品管。(注: A. 样品中谷胱甘肽浓度较高, 此处对原始样品进行 3 倍稀释, 最

终计算时需折算回来。B. 加入 15 μ L 缓冲液是为了保证样品和标样进行相同稀释操作。)

3) 标样检测及标准曲线的制作: 96 孔板中, 每孔加入 20 μ L 标样, 65 μ L 缓冲液, 37 $^{\circ}$ C 震荡孵育 10min 或室温震荡孵育 30min。建议孵育时盖上盖子已减少溶液在孵育过程中蒸发。建议每个样本做 3 个重复, 以获得更准确的数据。

孵育结束后, 向每孔加入 60 μ L 底物工作液、60 μ L 酶/辅酶工作液。加入酶/辅酶工作液后反应立即开始, 用酶标仪测定 412nm 处吸光度。选择 Kinetic 法测定, 每 10-30s 测一次, 共 10-20 次。建议使用多通道移液器操作以减少孔间误差。

根据不同时间测定得到的吸光度值, 以吸光度值为纵坐标, 时间为横坐标作图, 线性拟合得到斜率 K, 再以标准品的浓度为横坐标, 以 K 为纵坐标绘制标准曲线。

4) 待测样品的检测: 96 孔板中, 每孔加入 20 μ L 稀释后的待测样品、65 μ L 缓冲液, 37 $^{\circ}$ C 震荡孵育 10min 或室温震荡孵育 30min。建议孵育时盖上盖子以减少溶液在孵育过程中蒸发。建议每个样本重复做 3 个复孔, 以获得更准确的数据。

孵育结束后, 向每孔加入 60 μ L 底物工作液、60 μ L 酶/辅酶工作液。加入酶/辅酶工作液后反应立即开始, 用酶标仪测定 412nm 处吸光度。选择 Kinetic 法测定, 每 10-30s 测一次, 共 10-20 次。建议使用多通道移液器操作以减少孔间误差。

根据不同时间测定得到的吸光度值, 以吸光度值为纵坐标, 时间为横坐标作图, 线性拟合得到斜率 K, 对照标准曲线计算出待测样品中总谷胱甘肽(GSH+GSSG)含量。

注:由于样品经过稀释, 实际总谷胱甘肽(GSH+GSSG)含量为测出含量的 3 倍。

4.2 样品中氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 含量的测定

1) GSSG 标准样品的制备: 取 25 μ L 的 GSSG 标准溶液 (200 μ M), 加入 175 μ L 蛋白去除剂, 充分混匀后即成为 25 μ M GSSG 标准品溶液。用蛋白去除剂梯度稀释 GSSG 标准品溶液至终浓度为 25 μ M、12.5 μ M、6.25 μ M、3.13 μ M、1.57 μ M、0.78 μ M、0 μ M。取上述不同浓度的 100 μ L GSSG 标准样品, 分别加入 20 μ L 掩蔽剂, 混匀。(注: 梯度稀释方法为: 100 μ L 上一浓度的标准样品溶液加入 100 μ L 蛋白去除剂)

2) 待测样品的准备: 向 75 μ L 样品中加入 15 μ L 掩蔽剂, 涡旋混匀, 室温孵育>5min 即为待测样品管。(注: 1 加入 15 μ L 掩蔽剂是为了封闭样品中的 GSH。)

3) 标样检测及标准曲线的制作: 96 孔板中, 每孔加入 20 μ L 标样、60 μ L 缓冲液、5 μ L 淬灭剂, 37 $^{\circ}$ C 震荡孵育 10min 或室温震荡孵育 30min。建议孵育时盖上盖子以减少溶液在孵育过程中蒸发。建议每个样本重复做 3 个复孔, 以获得更准确的数据。

孵育结束后, 向每孔加入 60 μ L 底物工作液、60 μ L 酶/辅酶工作液。加入酶/辅酶工作液后反应立即开始, 用酶标仪测定 412nm 处吸光度。选择 Kinetic 法测定, 每 10-30s 测一次, 共 10-20 次。建议使用多通道移液器操作以减少孔间误差。

根据不同时间测定得到的吸光度值, 以吸光度值为纵坐标, 时间为横坐标作图, 线性拟合得到斜率 K, 再以标准品的浓度为横坐标, 以 K 为纵坐标绘制标准曲线。

4) 待测样品的检测: 96 孔板中, 每孔加入 20 μ L 稀释后的待测样品、65 μ L 缓冲液、5 μ L 淬灭剂, 37 $^{\circ}$ C 震荡孵育 10min 或室温震荡孵育 30min。建议孵育时盖上盖子以减少溶液在孵育过程中蒸发。建议每个样本重复做 3 个复孔, 以获得更准确的数据。

孵育结束后, 向每孔加入 60 μ L 底物工作液、60 μ L 酶/辅酶工作液。加入酶/辅酶工作液后反应立即开始, 用酶标仪测定 412nm 处吸光度。选择 Kinetic 法测定, 每 10-30s 测一次, 共 10-20 次。建议使用多通道移液器操作以减少孔间误差。

根据不同时间测定得到的吸光度值, 以吸光度值为纵坐标, 时间为横坐标作图, 线性拟合得到斜率 K, 对照标准曲线计算出待测样品中氧化型谷胱甘肽(GSSG)的含量。

注:还原型谷胱甘肽(GSH)可根据总谷胱甘肽含量(GSH+ GSSG)与氧化型谷胱甘肽(GSSG)含量来计算:还原型谷胱甘肽(GSH)=总谷胱甘肽(GSH+GSSG)-氧化型谷胱甘肽(GSSG)x2。

五、注意事项

- 1、 本试剂盒检测时涉及氧化还原反应, 因此在制备细胞或组织提取物时避免使用还原型物质, 如 DTT、B-巯基乙醇、TCEP 等。
- 2、 如果测定吸光值超过线性范围吸光值, 可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。
- 3、 本产品仅限于专业人员的科研使用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品。
- 4、 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。