

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

总谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽测定试剂盒
Total Glutathione /Oxidized Glutathione
(T-GSH/GSSG) Assay Kit

产品货号: BC00026

产品规格: 100T

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们:

✉ 邮箱 (销售) order@enkilife.cn

✉ 邮箱 (技术支持) tech@enkilife.cn

☎ 公司电话 027-87002838

🌐 网址 www.enkilife.cn



订阅微信公众号
获取更多技术
信息及前沿动态

保质期: 请见试剂盒外包装标签。

技术支持: 为了更好地给您提供服务, 联系时请告知产品外包装标签上批号。

基本信息

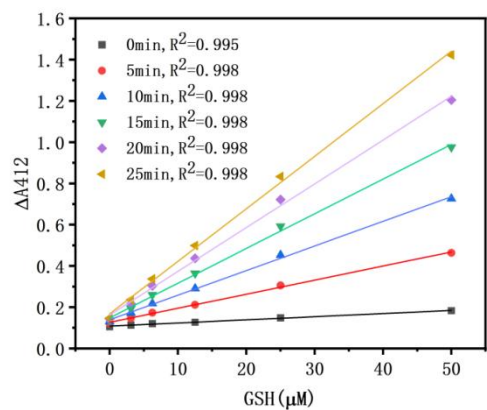
产品中文名称	总谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽测定试剂盒
产品英文名称	Total Glutathione /Oxidized Glutathione (T-GSH/GSSG) Assay Kit
检测方法	Colorimetric
样品类型	组织、细胞、血浆
检测类型	Quantitative
检测仪器及波长	酶标仪（405-414 nm，最佳检测波长 412nm）
检测范围	1-50μM
灵敏度	0.1436μM

产品简介

谷胱甘肽是一种由 3 个氨基酸残基组成的小肽， 全称为谷氨酰-半胱氨酰-甘氨酸， 英文名称为 glutamyl-cysteinylglycine， 简称 glutathione。由于半胱氨酸上的巯基(SH)为谷胱甘肽的活性基团， 所以常简写为 G-SH 或 GSH。谷胱甘肽包括还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, 常称为 GSH)和氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione disulfide)两种形式。由于氧化型谷胱甘肽是由两个 GSH 通过巯基脱氢而成， 所以常简写为 G-S-S-G 或 GSSG。还原型谷胱甘肽是绝大多数活细胞中巯基的主要来源， 对于维持蛋白质中巯基适当的氧化还原状态有重要作用， 并且是动物细胞中关键的抗氧化剂。总谷胱甘肽中通常 90-95%为还原型谷胱甘肽。

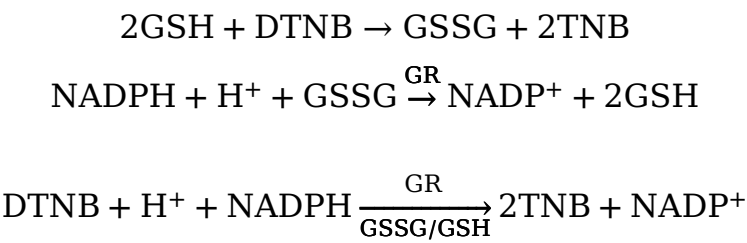
产品特点

★本试剂盒本试剂盒提供了蛋白去除试剂 S， 可以更加准确地测定出含有蛋白的样品中的总谷胱甘肽的量。本试剂盒的检测下限为 1μM。标准品的实测效果参考下图：



检测原理

谷胱甘肽还原酶可以还原氧化型谷胱甘肽(GSSG)生成还原型谷胱甘肽(GSH)，而 GSH 可以和生色底物 DTNB 反应产生黄色的 TNB 和 GSSG, 并可以通过测定 A412 来检测 TNB 的生成量。适当设置应体系，前后两个反应合并起来后，总谷胱甘肽(GSSG+GSH)就相当于一个颜色产生的限速因素，总谷胱甘肽的量就决定了黄色的 TNB 形成量。从而通过测定 A412 就可以计算出总谷胱甘肽的量。本试剂盒的具体反应原理如下：



产品组分

编号	产品名称	包装规格 (100T)	保存方式
试剂一	总谷胱甘肽检测缓冲液	60ml	-20℃
试剂二	谷胱甘肽还原酶	150μl	-20℃
试剂三	还原型谷胱甘肽(GSH)	4.5mg	-20℃，配制成溶液，分装后-20℃ 保存。
试剂四	DTNB	4.5mg	-20℃，配制成溶液，分装后-20℃ 保存。
试剂五	蛋白去除试剂 S	0.4g	-20℃，配制成溶液 2-8℃ 保存。
试剂六	NADPH	4mg	-20℃，NADPH 溶解后分装并-70℃ 保存， 2-8℃ 可以保存一天，-20℃保存一周后 NADPH 会降解 10%以上。
试剂七	DMSO	1.5ml	-20℃
耗材一	96 孔酶标板	1 板	RT

耗材二	96 孔覆膜	2 张	RT
-----	--------	-----	----

保存条件

未拆封的试剂盒可在 -20℃保存 12 个月。

实验前准备

• 样品处理

1. 组织样品的准备。取组织用液氮速冻，然后研成粉末。每 10 毫克研碎的组织粉末，加入 30 微升蛋白去除试剂 S 溶液，充分涡旋。再加入 70 微升蛋白去除试剂 S 溶液，用玻璃匀浆器充分匀浆(对于比较容易匀浆的组织可以不用液氮速冻等处理，而直接加入适量蛋白去除试剂 S 溶液进行匀浆)。4℃ 放置 10 分钟后，10,000g 4℃ 离心 10 分钟，取上清用于总谷胱甘肽的测定。样品需暂时 4℃ 保存，不立即测定的样品可以-70℃ 保存，但不宜超过 10 天。对于处理好的组织样品通常需用蛋白去除试剂 S 溶液进行适当稀释后再进行测定，稀释倍数通常为 5-20 倍。
2. 细胞样品的准备。请尽量使用新鲜的细胞进行测定，而不要使用冻存的细胞进行测定。PBS 洗涤细胞一次，离心收集细胞，吸尽上清。加入细胞沉淀体积 3 倍量的蛋白去除试剂 S 溶液，即如果细胞沉淀为 10 微升，则加入 30 微升蛋白去除试剂 S 溶液，充分涡旋。(细胞沉淀的体积可以根据细胞沉淀的重量进行估算。收集细胞前后分别对离心管进行称重，从而就可以计算出细胞沉淀的重量。10 毫克细胞沉淀的体积可以粗略地看做 10 微升。)然后利用液氮和 37℃ 水浴对样品进行两次快速的冻融。4℃ 或冰浴放置 5 分钟。4℃，10,000g 离心 10 分钟。取上清用于总谷胱甘肽的测定。样品需暂时 4℃ 保存，不立即测定的样品可以-70℃ 保存，但不宜超过 10 天。对于处理好的细胞样品通常需用蛋白去除试剂 S 溶液进行适当稀释后再进行测定，稀释倍数可以高达 20 倍。
3. 红细胞或血浆样品的准备。请尽量使用新鲜的血液进行测定。600g 离心 10 分钟，沉淀为红细胞，上清为血浆。对于红细胞，用 PBS 洗涤两次。取约 50 微升红细胞沉淀或血浆，加入 50 微升蛋白去除试剂 S 溶液，充分涡旋。4℃ 或冰浴放置 10 分钟。4℃，10,000g 离心 10 分钟。取上清用于总谷胱甘肽的测定。样品需暂时 4℃ 保存，不立即

测定的样品可以-70℃保存，但不宜超过 10 天。对于处理好的红细胞样品最后需用蛋白去除试剂 S 溶液稀释 10 倍后再进行后续的测定，而对于血浆样品，应直接取 10 微升进行测定。

4. 对于一些谷胱甘肽含量特别低的样品，可以通过冷冻干燥进行浓缩后再进行测定。

• **试剂盒的准备工作**

- 1. GSH 储备液的配制：在本试剂盒提供的 4.5mg GSH 中加入 1.5 毫升 Milli-Q 级纯水，溶解并混匀，即为 GSH 储备液，浓度为 10mM。除立即待用部分外，其余 GSH 储备液适当分装后-20℃保存。
- 2. DTNB 储备液的配制：在本试剂盒提供的 4.5mg DTNB 中加入 1.5 毫升本试剂盒提供的 DMSO，溶解并混匀，即为 DTNB 储备液。除立即待用部分外，其余 DTNB 储备液适当分装后-20℃避光保存。
- 3. 蛋白去除试剂 S 溶液的配制：在本试剂盒提供的 0.4 克蛋白去除试剂 S 中加入 8 毫升 Milli-Q 级纯水，配制成 8 毫升 5%的水溶液。 4℃保存。
- 4. NADPH 储备液(40mg/ml)的配制：在本试剂盒提供的 4mg NADPH 中加入 100 微升 Milli-Q 级纯水，溶解并混匀，即为 NADPH 储备液。除立即待用部分外，其余 NADPH 储备液适当分装后-70℃保存。
- 5. 5 倍稀释谷胱甘肽还原酶的配制：取 50 微升谷胱甘肽还原酶，加入 200 微升总谷胱甘肽检测缓冲液，混匀，即成 5 倍稀释的谷胱甘肽还原酶。
- 6. 总谷胱甘肽检测工作液的配制：根据待检测的样品数参考下表配制适当量的总谷胱甘肽检测工作液，表中三种试剂按比例混合后即为总谷胱甘肽检测工作液。

	1 个样品	10 个样品	20 个样品
5 倍稀释谷胱甘肽还原酶	6.6 μl	66 μl	132 μl
DTNB 储备液	6.6 μl	66 μl	132 μl
总谷胱甘肽检测缓冲液	150 μl	1.5 ml	3 ml

- 7. 0.5mg/ml NADPH 的配制：取 10 微升 NADPH 储备液，加入 790 微升总谷胱甘肽检测缓冲液，混匀即为 0.5mg/ml NADPH。每检测一个样品需 50 微升 0.5mg/ml

NADPH。

8. 标准品的制备：把 10mM GSH 储备液用总谷胱甘肽检测缓冲液稀释成 50μM GSH 溶液。然后按照对半稀释法，依次稀释成 25、12.5、6.25、3.125μM GSH 溶液。取 50、25、25、12.5、6.25、3.125、0μM GSH 溶液七个点做标准曲线。

操作流程

1. 参考下表，使用 96 孔板，依次加入样品或标准品，混匀。加入 150 微升总谷胱甘肽检测工作液后，混匀，25℃ 或室温孵育 5 分钟。

	空白对照(blank)	标准曲线(standard)	样品(sample)
样品或标准溶液	0 μl	10 μl	x μl
蛋白去除试剂 S 溶液	10 μl	0 μl	10-x μl
总谷胱甘肽检测工作液	150 μl	150 μl	150 μl
25℃ 或室温孵育	5 min	5 min	5 min
0.5mg/ml NADPH	50 μl	50 μl	50 μl

2. 每孔加入 50 微升 0.5mg/ml NADPH 溶液，混匀。
3. 立即使用适当的酶标仪或微量紫外分光光度计测定 A412，每 5 分钟测定一次或实时测定，共测定 25 分钟，测得 5 个数据。（说明：为了简化实验步骤，可以在加入 NADPH 溶液混匀后 25 分钟，仅测定一次 A412）。如果仪器可以设置温度，把温度设置在 25℃，否则就在室温状况下测定。如果酶标仪不能测定 A412，可以测定 405-414nm 附近范围的吸光度。如果标准曲线良好，但样品的吸光度比较低，可以延长孵育时间至 30-60 分钟，标准品和样品的吸光度在一定范围内会随时间的延长接近于线性增加的。

结果计算

1. 单点测定法：即反应 25 分钟(或 30-60 分钟)后仅测定一次吸光度。根据不同浓度标准品测得的不同吸光度作出标准曲线。样品对照标准曲线即可计算出总谷胱甘肽的含量。实际计算出来的总谷胱甘肽的含量相当于把氧化型谷胱甘肽的含量乘以 2 再加上还原型谷胱甘肽的含量。单点法测定相对比较便捷，而动力学法测定则相对比较精确。

2. 动力学测定法：先根据不同时间点测定得到的吸光度值计算出 $\Delta A_{412}/\text{min}$ 。然后以标准品的浓度为横坐标，以 $\Delta A_{412}/\text{min}$ 为纵坐标，做出标准曲线。根据样品的 $\Delta A_{412}/\text{min}$ ，对照标准曲线就可以计算出测定时样品中总谷胱甘肽的含量。
3. 同时根据样品的稀释倍数、以及最初样品的使用量，可以计算出每毫克组织或细胞中的总谷胱甘肽的含量。对于细胞样品，也可以根据最初细胞的使用数量，然后另外取一定数量的细胞裂解后测定蛋白浓度，从而计算出细胞样品的蛋白量，最后计算出每毫克蛋白中总谷胱甘肽的含量。

注意事项

1. 本试剂盒检测时牵涉到氧化还原反应，所有氧化剂或还原剂都会干扰本试剂盒的测定。特别是 DTT、巯基乙醇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. 一定要严格控制反应时的温度和反应时间，否则需每次都做标准曲线。
3. NADPH 等试剂不太稳定，要严格按照后续说明操作，谨防失活。
4. DMSO 在 4°C、冰浴等较低温度情况下会凝固，可以 20-25°C 水浴温育片刻至全部融解后使用。
5. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。