

## 氧化型/还原型谷胱甘肽定量试剂盒

产品货号：BA3490

产品规格：100T

### 产品简介：

谷胱甘肽( $\gamma$ -L-谷氨酰-L-半胱氨酰-甘氨酸)是体内的一种三肽化合物，它参与抗氧化和药物代谢的过程，还是谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽S-转移酶、巯基转移酶等的底物。谷胱甘肽通常以还原型状态(GSH)存在，但是GSH在氧化应激的作用下会转化为氧化型状态(GSSG)。因此GSH/GSSG的比值被认为是氧化应激研究的一个重要指标。

本试剂盒中含有GSH掩蔽剂，加入掩蔽剂可以除去样品溶液中的GSH。因此可以通过检测加入DTNB(5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid))后在412nm处的显色反应加上在谷胱甘肽还原酶作用下的循环体系选择性地对GSSG进行定量。GSH含量则可以通过总谷胱甘肽含量减去GSSG含量来得到。本试剂盒总谷胱甘肽和GSSG的检测限分别为 $0.5\mu\text{mol/l}$ - $50\mu\text{mol/l}$ 和 $0.5\mu\text{mol/l}$ - $25\mu\text{mol/l}$ 。

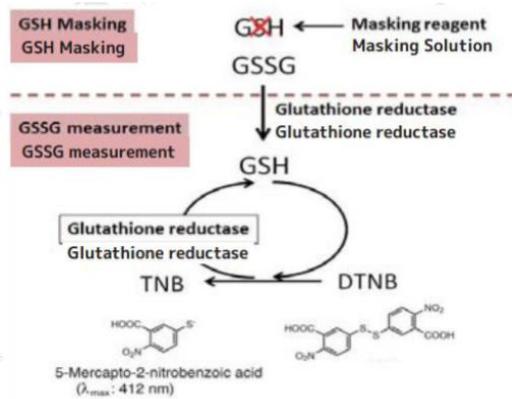


图 1. GSSG/GSH 检测原理

### 产品组成：

组分名称	100T
Enzyme Solution	$50\mu\text{l} \times 1$ 管
Coenzyme	$\times 1$ 管
Buffer Solution	$60\text{ml} \times 1$ 管
Substrate (DTNB)	$\times 2$ 管
Standard GSH	$\times 1$ 管
Standard GSSG	$\times 1$ 管
Masking Solution	$1\text{ml} \times 1$ 管

### 所需的设备和材料：

酶标仪(405或415nm)、 $20\mu\text{l}$ 和 $200\mu\text{l}$ 移液器，多通道移液器、96孔板、培养箱、 $15\text{ml}$ 锥形管、5-碘基水杨酸(SSA)溶液、乙醇。

### 样品制备：

#### 1. 组织(100mg)

- 在  $0.5\text{-}1.0\text{ml}$  5% 的 SSA 溶液中对组织匀浆。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物技术有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>

2) 匀浆后的组织样品在 8,000×g, 离心 10min。

3) 转移上清液至一支新管中, 用 ddH<sub>2</sub>O 稀释, 将 SSA 浓度调节为 0.5%。<sup>a)</sup>

## 2. 细胞(1×10<sup>7</sup>个细胞)

1) 在 4°C, 200×g 离心 10min 后收集细胞, 弃上清。

2) 用 300μl PBS 清洗细胞, 在 4°C, 200×g 离心 10min, 弃上清。

3) 加入 80μl 10 mM HCl, 反复冻融 2 次使细胞裂解。

4) 加入 20μl 5% 的 SSA, 在 8,000×g 离心 10min。

5) 转移上清液至一支新管中, 用 ddH<sub>2</sub>O 稀释, 将 SSA 浓度调节为 0.5%。<sup>a)</sup>

## 3. 血浆

1) 在 4°C, 1,000×g 离心抗凝处理的血液 10min。

2) 将最上层的血浆转移至一支新管中, 加入血浆量的 1/2 体积的 5% 的 SSA。

3) 在 4°C, 8,000×g 离心 10min。

4) 转移上清液至一支新管中, 用 ddH<sub>2</sub>O 稀释, 将 SSA 浓度调节为 0.5%。<sup>a)</sup>

## 4. 红血球<sup>b)</sup>

1) 在 4°C, 1,000×g 离心抗凝处理的血液 10min。

2) 弃上清液及白膜层。

3) 用 4 倍体积的 5% SSA 溶解红血球。

4) 在 4°C, 8,000×g 离心 10min。

5) 转移上清液至一支新管中, 用 ddH<sub>2</sub>O 稀释, 将 SSA 浓度调节为 0.5%。<sup>a)</sup>

a) 在使用样品溶液前, 请先用 ddH<sub>2</sub>O 稀释, 将 SSA 浓度调节为 0.5%, 高浓度的 SSA 会引起溶液 pH 值的变化, 对检测有所干扰。

b) 血球能从血浆分离后所剩样品溶液中分离。

## 反应溶液的制备:

### 1. Substrate Working Solution

1) 加 1.2ml Buffer Solution 至 Substrate (DTNB)管中, 溶解 DTNB。

\* 请确认是否完全溶解 DTNB。如溶解不完全时, 请用超声或涡旋振荡。

\* 如需保存, 则不要继续步骤 2)。直接放在-20°C 保存, 可以保存 2 个月。

2) 转移上述全部溶液至 15ml 锥形管中, 并用 2.4ml Buffer Solution 稀释(总体积为 3.6ml)。

\* 一个 96 孔板需要使用 2 管 Substrate (总体积: 7.2ml)。

\* 由于 Substrate Working Solution 不稳定, 所以需要现配现用。

### 2. Enzyme/Coenzyme Working Solution

1) 用移液器吹打混匀 Enzyme Solution, 吸取 20μl 至 15ml 锥形管中, 用 4ml Buffer Solution 稀释。

\* Enzyme Solution 可能会附着在管的内壁和盖子上, 开瓶前可轻摇甩下, 但是不可使用旋涡震荡器。

\* 如需保存, 则不要继续步骤 2)。直接放在 0-5°C 保存, 可以保存 2 个月。

2) 取 2.4ml 上述溶液至一支新的 15ml 锥形管中。

3) 加 2.4ml ddH<sub>2</sub>O 至 Coenzyme 管中并溶解。

\* 由于 Coenzyme 管做过减压处理, 请用注射器加入 ddH<sub>2</sub>O 后再打开。

\* 如需保存, 则不要继续步骤 4), 将上述溶液放在-20°C 保存, 可以保存 2 个月。

4) 转移上述全部溶液至步骤 2)的 15ml 锥形管中, 并用 2.4ml Buffer Solution 稀释(总体积: 7.2ml)。

\* 由于 Enzyme/Coenzyme Working Solution 不稳定, 需要现配现用。

### 3. 200μmol/l GSH Standard Solution



扫一扫 加微信

上海尚宝生物技术有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>

加 2.0ml 0.5% 的 SSA 至 Standard GSH 管中并溶解。

\* 由于 Standard GSH 管做过减压处理, 请用注射器加入 SSA 后再打开。

\* 将 GSH Standard Solution 溶液放在-20°C 保存, 可以保存 2 个月。

#### 4. 100 $\mu$ mol/l GSSG Standard Solution

加 2.0ml 0.5% 的 SSA 至 Standard GSSG 管中并溶解。

\* 由于 Standard GSSG 管做过减压处理, 请用注射器加入 SSA 后再打开。

\* 将 GSSG Standard Solution 溶液放在-20°C 保存, 可以保存 2 个月。

### 操作步骤: (仅供参考)

#### 1. 样品制备

1) 如需要测定 GSH 和 GSSG, 请准备 2 组样品溶液(200 $\mu$ l $\times$ 2)。

● 测定 GSSG: 加 200 $\mu$ l 的样品, 20 $\mu$ l 的 Masking Solution 至一个微管中, 用涡旋振荡器混匀, 作为(GSSG)样品管。

● 测量总谷胱甘肽: 取 200 $\mu$ l 样品加入管中, 加入 20 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 用涡旋振荡器混匀。

\*如果样品溶液中总谷胱甘肽的浓度范围未知, 可梯度稀释样品溶液。

#### 2. GSSG Standard Solution 的制备

1) 分别取 100 $\mu$ l 的 100 $\mu$ mol/l GSSG Standard Solution 和 300 $\mu$ l 0.5% SSA 溶液至微管中, 混合制备终浓度为 25 $\mu$ mol/l 的 GSSG Standard Solution。用 0.5% SSA 溶液按图 2 中步骤进行梯度稀释以制备成下列 GSSG Standard Solution, 浓度依次为: 25.0, 12.5, 6.25, 3.13, 1.57, 0.78 和 0 $\mu$ mol/l。

2) 在上述 GSSG Standard Solution 中加入 20 $\mu$ l Masking Solution, 用涡旋振荡器混匀。

#### 3. GSH Standard Solution 的制备

1) 分别取 100 $\mu$ l 浓度为 200 $\mu$ mol/l 的 GSH Standard Solution 和 300 $\mu$ l 0.5% 的 SSA 溶液至微管中, 混合制备终浓度为 50 $\mu$ mol/l GSH Standard Solution。用 0.5% SSA 溶液进行梯度稀释以制备成下列 GSH Standard Solution, 浓度依次为: 50.0, 25.0, 12.5, 6.25, 3.13, 1.57 和 0 $\mu$ mol/l。

2) 在配制好的 200 $\mu$ l GSH Standard Solution 中加入 20 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 用涡旋振荡器混匀。

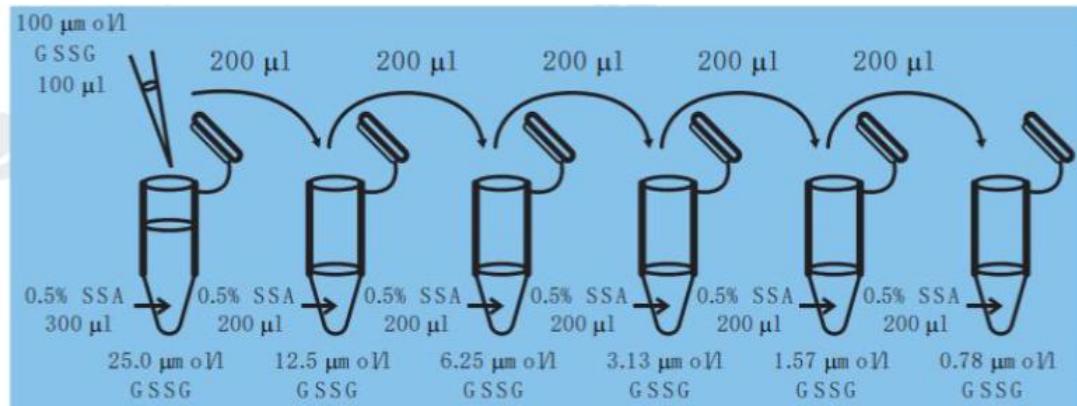


图2. GSSG Standard Solution 的制备

#### 4. 检测

1) 每孔加入 40 $\mu$ l GSSG Standard Solution, GSH Standard Solution, GSSG 样品或 GSH 样品。

\* 建议每个样品重复 3 次, 以获得准确的数据。

2) 每孔加入 60 $\mu$ l Buffer Solution。

3) 在 37°C 培养 1 h。

\* 培养时盖上盖子以防止溶液在培养过程中蒸发。



上海尚宝生物技术有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>

扫一扫 加微信

- 4) 每孔加入 60μl Substrate Working Solution。
- 5) 每孔加入 60μl Enzyme/Coenzyme Working Solution。
  - \* 加入 Enzyme/ Coenzyme Working Solution 后, 反应立即开始。建议用多通道移液器操作以减少各孔间误差。
- 6) 在 37°C 培养 10min。
  - \* 如果选择 Kinetics 法, 请选择“Kinetic”模式。
  - \* 在反应开始后的 10min, OD 值呈线性增长, 因此可以采用 Kinetic 法或 Pseudo-Endpoint 法测定谷胱甘肽浓度(测定 5-10min 内的某个时间点的 OD 值, 不需要终止反应)
- 7) 用酶标仪在 405nm 或 415nm 下测定吸光度。
- 8) 用 GSSG 标准曲线测定所得 GSSG 样品溶液中的 GSSG 浓度。
- 9) 用 GSH 标准曲线测定所得 GSH 样品溶液中总谷胱甘肽(GSH+GSSG)的浓度。

谷胱甘肽浓度可以采用Kinetic法或Pseudo-Endpoint法测定

Pseudo-Endpoint法: Glutathione(GSH, GSSG)=(OD<sub>sample</sub>-OD<sub>blank<sup>a</sup></sub>)/Slope<sup>b</sup>)

Kinetic法: Glutathione (GSH, GSSG)=(Slope<sub>sample<sup>c</sup></sub>)-Slope<sub>blank<sup>a),c</sup></sub>)/ slope<sup>b</sup>)

  - a) 采用图3中的A1-A3孔或A7-A9孔的OD值。
  - b) Slope 为标准品采用Kinetic法或Pseudo-Endpoint法测定得到的曲线斜率。
  - c) Slope<sub>sample</sub>(或Slope<sub>blank</sub>)为每个样品(或Blank)采用Kinetic法测定得到的曲线斜率。

\* 如果测定样品是由原始样品稀释得来, 则将上述测定值乘以稀释倍数, 以计算原始样品的谷胱甘肽浓度。
- 10) GSH 浓度使用以下公式计算 【总谷胱甘肽(GSH+GSSG)和 GSSG】  
$$\text{GSH} = \text{Total Glutathione(GSH+GSSG)} - \text{GSSG} \times 2$$

### 干扰物:

一些还原剂如抗坏血酸,  $\beta$ -巯基乙醇, 二硫苏糖醇(DTT)和半胱氨酸, 或巯基反应性化合物如马来酰亚胺化合物会干扰谷胱甘肽测定。因此在样品制备过程中应避免使用这些物质。

### 注意事项:

1. 请先将本试剂盒恢复至室温后再使用。
2. 建议每组样品设定 3 个复孔, 以便得到更准确的数据。
3. 由于加入 Enzyme/Coenzyme Working Solution 之后会立刻产生显色反应, 因此尽量使用多通道移液器以减少各孔之间的误差。
4. 如不知道样品中总谷胱甘肽含量的浓度范围, 就请准备多个浓度梯度的样品溶液。
5. 试剂盒中有带铝盖的玻璃管, 请小心拿取。

**保存:** 2-8°C 保存。请先将本试剂盒恢复至室温后再使用。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物技术有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>