

改良型 氧化型/还原型谷胱甘肽含量检测试剂盒  
(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

-20℃稳定储存 1 年, 开封后-20℃稳定储存 2 个月。

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0702	氧化型/还原型谷胱甘肽含量检测试剂盒	100T

产品内容

名称	规格
酶液	20U
辅酶	4.4mg
底物 (DTNB)	4.4mg
还原型谷胱甘肽 (GSH) 标准品	0.123mg
氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 标准品	0.123mg
掩蔽剂	3.3mg
淬灭剂	0.57mg
蛋白去除剂	15mL
缓冲液	30mL

一、产品说明

翼飞雪氧化型/还原型谷胱甘肽含量检测试剂盒适用于定量检测组织、细胞、全血、血浆、血清、尿液等样本中的还原型和氧化型谷胱甘肽 (GSH/ GSSG) 的含量, 本试剂盒的线性检测范围为 0.1-3 $\mu$ M GSH, 检测下限为 10nM GSH。

谷胱甘肽是由甘氨酸、谷氨酸、半胱氨酸组成的三肽, 在许多生物过程中 (包括蛋白质和 DNA 合成、氨基酸转运、氧化应激保护等) 发挥着关键作用, 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, 自身转化为氧化型谷胱甘肽 (GSSG)。

翼飞雪氧化型/还原型谷胱甘肽检测试剂盒基于 5,5'-二硫代-双-(2-硝基苯甲酸) (5,5'-dithiobis-2-nitrobenoic acid, DTNB) 和谷胱甘肽还原酶 (GR) 之间的酶解反应, 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), 2-硝基-5-巯基苯甲酸 (TNB) 在 412nm 处的吸光度与样品中的谷胱甘肽浓度成正比。本试剂盒还可用于检测氧化谷胱甘肽 (GSSG), 先使用 1-甲基-2-乙烯基吡啶鎓三氯酸盐作为清除剂试剂清除所有现有的谷胱甘肽再进行检测。

二、样品制备

1、组织: 组织样品剪碎后液氮速冻, 然后迅速研磨成粉末。按照 10mg 组织粉末: 100 $\mu$ L 蛋白去除剂的比例, 充分混匀并用玻璃匀浆仪充分匀浆, 4℃ 孵育 10min, 4℃ 10000g 离心 10min, 取上清代待测。

2、细胞: 收集细胞并用 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, 超声波破碎, 4℃ 10000g 离心 10min, 取上清待测。

3、红细胞或血浆：取新鲜血液 600g 离心 10min，上清部分为血浆直接吸取、待测；沉淀部分即为红细胞，用 PBS 洗涤红细胞 2 次，取 50 $\mu$ L 红细胞沉淀，加入 50 $\mu$ L 蛋白去除剂，4 $^{\circ}$ C 或冰浴充分混匀。超声裂解细胞，4 $^{\circ}$ C 10000 g 离心 10min，取上清待测。

- 注：
- 1) 容易匀浆的组织可直接快速匀浆，无需液氮速冻。
  - 2) 样品立即检测可置于 4 $^{\circ}$ C 短期储存，短期内不能检测可 -80 $^{\circ}$ C 储存，但时间不能超过 1 周。
  - 3) 样品裂解后需立即转移至冰上，以防 GSH 在空气中氧化成 GSSG。

### 三、试剂准备

#### 1、底物工作液

每管底物 (DTNB) 用 264 $\mu$ L DMSO 配置成底物储备液 (25 $\times$ )，用缓冲液稀释 25 倍为底物工作液。

- 注：
- 1) 底物工作液不稳定，需用现配：按照 96 孔板每个标样或样品孔需要 60 $\mu$ L 底物工作液的用量，根据具体样品和标样数量，来制备适当体积的底物工作液。
  - 2) 底物储备液 -20 $^{\circ}$ C 可储存 2 个月，避免反复冻融。

#### 2、酶/辅酶工作液

- 1) 每管酶中加入 1.1mL 缓冲液溶解配置成酶工作液。
- 2) 每管辅酶中加入 1.1mL 缓冲液溶解配置成辅酶工作液。

将酶工作液和辅酶工作液转移至 15mL 离心管中混合，再加入 4.4mL 缓冲液配置成酶/辅酶工作液。

- 注：
- 1) 酶/辅酶工作液不稳定，需用现配：按照 96 孔板每个标样或样品孔需要 60 $\mu$ L 酶/辅酶工作液的用量，根据具体样品和标样数量，来制备适当体积的酶/辅酶工作液。
  - 2) 酶/辅酶工作液 -20 $^{\circ}$ C 可储存 2 个月，避免反复冻融。

#### 3、GSH 标准溶液 (400 $\mu$ M)

每管 GSH 标样中加入 1mL 蛋白去除剂，配置成 400 $\mu$ M 的 GSH 标准溶液。GSH 标准溶液可 -20 $^{\circ}$ C 保存 2 个月。

#### 4、GSSG 标准溶液 (200 $\mu$ M)

每管 GSSG 标样中加入 1mL 蛋白去除剂，配置成 200 $\mu$ M 的 GSSG 标准溶液。GSSG 标准溶液可 -20 $^{\circ}$ C 保存 2 个月。

#### 5、掩蔽剂

每管掩蔽剂中加入 2.2mL 缓冲液，配置成掩蔽剂储液。掩蔽剂储液可 -20 $^{\circ}$ C 保存 2 个月。

#### 6、淬灭剂

每管淬灭剂中加入 0.55mL 缓冲液，配置成淬灭剂储液。淬灭剂储液可 -20 $^{\circ}$ C 保存 2 个月。

### 四、样品中总谷胱甘肽 (GSH+GSSG) 含量的计算

#### 1、GSH 标准品准备

- 1) 取 25 $\mu$ L GSH 标准溶液 (400 $\mu$ M)，加入 175 $\mu$ L 蛋白去除剂，混匀后即为 50 $\mu$ M 的 GSH 标准溶液。
- 2) 用蛋白去除剂梯度稀释 GSH 标准溶液至终浓度为 50 $\mu$ M、25 $\mu$ M、12.5 $\mu$ M、6.25 $\mu$ M、3.13 $\mu$ M、1.57 $\mu$ M、0 $\mu$ M (稀释方法：100 $\mu$ L 上一浓度标准溶液加入 100 $\mu$ L 蛋白去除剂)。
- 3) 分别取 100 $\mu$ L 的上述不同浓度的 GSH 标准溶液，各加入 20 $\mu$ L 缓冲液，混匀。

#### 2、待测样品制备

向 25 $\mu$ L 待测样品中分别加入 50 $\mu$ L 蛋白去除剂和 15 $\mu$ L 缓冲液，涡旋混匀，即为待测管。

注: 1) 样品中总谷胱甘肽浓度较高, 本步骤对样品进行 3 倍稀释, 最终计算含量时需要折算回来。

2) 加入 15 $\mu$ L 缓冲液是为了保证样品和标准溶液进行相同稀释操作。

### 3、标样检测及制作标准曲线

1) 向 96 孔板中的每孔加入 20 $\mu$ L 标准溶液、65 $\mu$ L 缓冲液, 37 $^{\circ}$ C 震荡孵育 10min 或室温震荡孵育 30min。

注: 1) 孵育时盖上盖子, 以防止孵育过程中水分蒸发。

2) 建议每个样本做 3 次重复, 以获得更准确的数据。

2) 每孔加入 60 $\mu$ L 底物工作液、60 $\mu$ L 酶/辅酶工作液。

3) 立即用酶标仪测定 412nm 吸光值。

注: 1) 建议选择 Kinetic 法测定, 每 25S 测一次, 共测 15-20 次。

2) 建议使用多通道移液器进行操作, 以减少孔间误差。

4) 标曲制作: 根据不同时间测定得到的吸光值线性拟合得到斜率 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、待测样品检测

1) 96 孔板中, 每孔加入 20 $\mu$ L 稀释后的待测样品、65 $\mu$ L 缓冲液, 37 $^{\circ}$ C 震荡孵育 10min 或室温震荡孵育 30min。

注: 1) 孵育时盖上盖子, 以防止孵育过程中水分蒸发。

2) 建议每个样本做 3 次重复, 以获得更准确的数据。

2) 每孔加入 60 $\mu$ L 底物工作液、60 $\mu$ L 酶/辅酶工作液。

3) 立即用酶标仪测定 412nm 吸光值。

注: 1) 建议选择 Kinetic 法测定, 每 25S 测一次, 共测 15-20 次。

2) 建议使用多通道移液器进行操作, 以减少孔间误差。

4) 根据待测样品不同时间测定得到的吸光值线性拟合得到的斜率 K, 对照标准曲线计算出待测样品中总谷胱甘肽 (GSH+GSSG) 的含量。

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

## 五、样品中氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 含量的测定

### 1、GSSG 标准样品的准备

1) 取 25 $\mu$ L GSSG 标准溶液 (200 $\mu$ M), 加入 175 $\mu$ L 蛋白去除剂, 充分混匀, 即为 25 $\mu$ M 的 GSSG 标准品溶液。

2) 用蛋白去除剂梯度稀释 GSSG 标准溶液至终浓度为 25 $\mu$ M、12.5 $\mu$ M、6.25 $\mu$ M、3.13 $\mu$ M、1.57 $\mu$ M、0.785 $\mu$ M、0 $\mu$ M (稀释方法: 100 $\mu$ L 上一浓度标准溶液加入 100 $\mu$ L 蛋白去除剂)。

3) 分别取 100 $\mu$ L 的上述不同浓度的 GSSG 标准溶液, 各加入 20 $\mu$ L 掩蔽剂, 混匀。

### 2、待测样品的准备

向 75 $\mu$ L 待测样品中加入 15 $\mu$ L 掩蔽剂, 涡旋混匀, 室温孵育 $\geq$ 5min, 即为待测样品管。

注: 加入掩蔽剂, 是为了封闭样品中的 GSH。

### 3、标样检测及制作标准曲线

1) 向 96 孔板中的每孔加入 20 $\mu$ L 稀释后的标准溶液、60 $\mu$ L 缓冲液、5 $\mu$ L 淬灭剂, 37 $^{\circ}$ C 震荡孵育 10min 或室温震荡孵育 30min。

注: 1) 孵育时盖上盖子, 以防止孵育过程中水分蒸发。

2) 建议每个样本做 3 次重复, 以获得更准确的数据。

2) 每孔加入 60 $\mu$ L 底物工作液、60 $\mu$ L 酶/辅酶工作液。

3) 立即用酶标仪测定 412nm 吸光值。

注: 1) 建议选择 Kinetic 法测定, 每 25S 测一次, 共测 15-20 次。

2) 建议使用多通道移液器进行操作, 以减少孔间误差。

4) 标曲制作: 根据不同时间测定得到的吸光度值线性拟合得到斜率 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

1) 96 孔板中, 每孔加入 20 $\mu$ L 稀释后的待测样品、60 $\mu$ L 缓冲液、5 $\mu$ L 淬灭剂, 37 $^{\circ}$ C 震荡孵育 10min 或室温震荡孵育 30min。

注: 1) 孵育时盖上盖子, 以防止孵育过程中水分蒸发。

2) 建议每个样本做 3 次重复, 以获得更准确的数据。

2) 每孔加入 60 $\mu$ L 底物工作液、60 $\mu$ L 酶/辅酶工作液。

3) 即用酶标仪测定 412nm 吸光值。

注: 1) 建议选择 Kinetic 法测定, 每 25S 测一次, 共测 15-20 次。

2) 建议使用多通道移液器进行操作, 以减少孔间误差。

4) 据不同时间测定得到的吸光度值线性拟合得到的斜率 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。

## 六、样品中还原型谷胱甘肽含量的计算

还原型谷胱甘肽含量 (GSH) = 总谷胱甘肽 (GSH+GSSG) 含量 - 氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 含量  $\times 2$ 。

## 七、注意事项

1、本试剂盒检测时涉及氧化还原反应, 所有氧化剂或还原剂都会干扰本试剂盒的测定, 特别是 DTT、beta-巯基乙醇、半胱氨酸还原剂、马来酰亚胺化合物等会严重干扰谷胱甘肽的测定, 请尽量避免。

2、如果测定值超过现行范围吸光值, 可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。

3、为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。