

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K097-M

产品规格: 96T(80 samples)

检测仪器: 酶标仪(405-415 nm)

Elabscience®总谷胱甘肽 (T-GSH) /氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 比色法测试盒

Total Glutathione (T-GSH) / Oxidized Glutathione (GSSG) Colorimetric Assay Kit

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：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

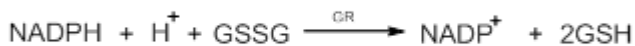
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清（浆）、动物组织、红细胞和培养细胞中的总谷胱甘肽（T-GSH）和氧化型谷胱甘肽（GSSG）含量。

检测原理

通过谷胱甘肽还原酶把 GSSG 还原成 GSH，而 GSH 可以和生色底物 DTNB 反应产生 GSSG 和黄色的 TNB，总谷胱甘肽（GSSG+GSH）的量决定了黄色的 TNB 形成量。从而通过测定 A_{412} 就可以计算出总谷胱甘肽的量。再用适当试剂先清除样品中的 GSH 然后利用上述反应原理就可以测定出 GSSG 的含量（如下图）。



提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	45 mL×2 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	标准品 (Standard)	6.13 mg×1 支	-20℃ 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	蛋白去除剂 (Protein Precipitator)	50 mL×2 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	酶储备液 (Enzyme Stock Solution)	80 μL×1 支	-20℃ 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	显色剂 (Chromogenic Agent)	1.5 mL×1 支	-20℃避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	GSH 清除辅助液(GSH Scavenger Auxiliary Solution)	2 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	GSH 清除剂 (GSH Scavenger)	0.5 mL×1 支	-20℃避光 保存 6 个月

试剂八 (Reagent 8)	底物 (Substrate)	粉剂×1支	-20℃避光 保存6个月
	96孔酶标板	1板	
	96孔覆膜	2张	
	样本位置标记表	1张	

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

规格测样说明，若只测定总谷胱甘肽或氧化型谷胱甘肽可测定80样，若测定还原型谷胱甘肽可测定32样。

所需自备物品

仪器：酶标仪（405-415 nm，最适检测波长412 nm）、涡旋混匀仪，100 μL，10 μL）、离心机。

耗材：枪头（1000 μL，200 μL，10 μL）、EP管（0.5、2、5、10 mL）。

试剂：超纯水、PBS（0.01 M，pH 7.4）、无水乙醇。

试剂准备

① 检测前，将试剂四置于冰盒上，其他试剂平衡至室温。

② 1 mmol/L标准品储备液的配制：

取一支试剂二用10 mL超纯水溶解，未用完部分，分装后-20℃保存一个月。

③ 20 μmol/L标准品：

按照1 mmol/L标准品储备液：试剂三=1：49的体积比例配制，现用现配，2-8℃保存24 h。

④ 反应工作液的配制：

按试剂四：试剂五：试剂一=1：20：519的体积比例配制，现用现配，2-8℃保存24 h。

⑤ 试剂六工作液的配制:

缓慢吸取试剂六，按照试剂六：超纯水=1：1的体积比配制，现用现配，2-8℃保存24 h。

⑥ 试剂七工作液的配制:

按照试剂七：无水乙醇=1：9体积比配制，现用现配，2-8℃保存24 h。

⑦ 试剂八储备液的配制:

取100 μL超纯水加入到试剂八冻存管中，充分混匀溶解。未用完部分，分装-70℃保存3个月。

⑧ 试剂八工作液的配制:

按照试剂八储备液：试剂一=1:79的体积比配制，现用现配，2-8℃保存24 h。

⑨ 不同浓度标准品的稀释:

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(μmol/L)	0	0.5	1	2	5	8	10	15
20 μmol/L 标准品(μL)	0	10	20	40	100	160	200	300
试剂三(μL)	400	390	380	360	300	240	200	100

样本准备

① 样本处理

样本要求：样本中不能含有 DTT、2-巯基乙醇等还原性试剂。

血清（浆）、全血、红细胞样本处理：将收集好的血清（浆），按照血清（浆）：试剂三=1：4 的体积比例混匀（100 μ L 样本，加入 400 μ L 试剂三），涡旋混匀 30 s，4 $^{\circ}$ C 静置 5 min，3100 \times g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

动物组织样本处理：按照重量（g）：体积（mL）=1：9 的比例加入试剂三，进行匀浆，4 $^{\circ}$ C，10000 \times g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

细胞样本处理：按照 10⁶ 个细胞加入 400 μ L 的比例加入试剂三，进行机械匀浆，充分破碎（无明显的细胞沉淀，可在显微镜下观察），4 $^{\circ}$ C，10000 \times g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择 2-3 个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，不同样本的稀释如下表（仅供参考）：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%大鼠心脏匀浆	10-20	人血浆	不稀释
10%大鼠肝脏匀浆	10-20	10%大鼠肾匀浆	不稀释
10%小鼠脑匀浆	2-5	HepG2 细胞	不稀释

注：稀释液为试剂三。

实验关键点

- ① 试剂四使用前必须先混匀。
- ② 试剂六黏度很高，取用时要小心缓慢。
- ③ 试剂七有刺激性气味，取用时在通风橱内操作。

操作步骤

总谷胱甘肽测定：

- ① 标准孔：取 10 μL 不同浓度标准品，加入到对应的标准孔中；
样本孔：取 10 μL 待测样本，加入到样本孔中；
- ② 向①中各孔加入 150 μL 反应工作液。
- ③ 25 $^{\circ}\text{C}$ 或室温条件下孵育 5 min。
- ④ 向标准、测定各孔中加入 50 μL 试剂八工作液。
- ⑤ 酶标仪上振荡 5 s，25 $^{\circ}\text{C}$ 或室温条件下孵育 25 min。
- ⑥ 酶标仪 412 nm 处，测定各孔 OD 值。

氧化型谷胱甘肽测定：

标准品的准备：取不同浓度标准品，按照每 100 μL 标准品，加入 20 μL 的试剂六工作液，立即涡旋混匀，然后各取出 100 μL 于对应的 0.5 mL EP 管中，向 EP 管中加入 4 μL 试剂七工作液后，立即涡旋混匀，25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1h。

样本中 GSH 的清除：取经过试剂三处理好的样本，按照每 100 μL 样本，加入 20 μL 的试剂六工作液，立即涡旋混匀，取出 100 μL 于 0.5 mL EP 管中，向 EP 管中加入 4 μL 试剂七工作液后，立即涡旋混匀，25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1h。

- ① 标准孔：取 10 μL 不同浓度标准品（经上述试剂六、七工作液处理 1 h 的标准品），加入到对应的标准孔中；
样本孔：取 10 μL 待测样本（经上述试剂六、七工作液处理 1 h 的样本），加入到样本孔中；
- ② 向①中各孔加入 150 μL 反应工作液。
- ③ 25 $^{\circ}\text{C}$ 或室温条件下孵育 5 min。
- ④ 向标准、测定各孔中加入 50 μL 试剂八工作液。
- ⑤ 酶标仪上振荡 5 s，25 $^{\circ}\text{C}$ 或室温条件下孵育 25 min。
- ⑥ 酶标仪 412 nm 处，测定各孔 OD 值。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度标准品 (μL)	10	--
待测样本 (μL)	--	10
反应工作液 (μL)	150	150
25°C或室温孵育 5 min		
试剂八工作液 (μL)	50	50
酶标仪上震板 5 s, 25°C或室温条件下孵育 25 min, 酶标仪 412 nm 处测定各孔 OD 值。		

结果计算

T-GSH 标准品拟合曲线: $y = a_1x + b_1$

GSSG 标准品拟合曲线: $y = a_2x + b_2$

血清(浆)、全血、红细胞中 T-GSH、GSSG 含量:

$$\text{T-GSH 含量} = (\Delta A_1 - b_1) \div a_1 \times 2^* \times 5^{**} \times f$$

(μmol/L)

$$\text{GSSG 含量} = (\Delta A_2 - b_2) \div a_2 \times 5^{**} \times f$$

(μmol/L)

动物组织中 T-GSH、GSSG 含量:

$$\text{T-GSH 含量} = (\Delta A_1 - b_1) \div a_1 \times 2^* \div \frac{m}{V_1} \times f$$

(μmol/g)

$$\text{GSSG 含量} = (\Delta A_2 - b_2) \div a_2 \div \frac{m}{V_1} \times f$$

(μmol/g)

培养细胞中 T-GSH、GSSG 含量:

$$\text{T-GSH 含量} \quad (\mu\text{mol}/10^9) = (\Delta A_1 - b_1) \div a_1 \times 2^* \div \frac{1^{***}}{V_2} \times f$$

$$\text{GSSG 含量} \quad (\mu\text{mol}/10^9) = (\Delta A_2 - b_2) \div a_2 \div \frac{1^{***}}{V_2} \times f$$

注: 还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量 = T-GSH 含量 - 2*×GSSG 含量

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

ΔA_1 : 样本测定 OD 值-空白 OD 值 (测定 T-GSH)

a_1 : 标曲斜率 (测定 T-GSH)

b_1 : 标曲截距 (测定 T-GSH)

ΔA_2 : 样本测定 OD 值-空白 OD 值 (测定 GSSG)

a_2 : 标曲斜率 (测定 GSSG)

b_2 : 标曲截距 (测定 GSSG)

2*: 用 GSSG 作为标准品换算成 GSH 时, 需要乘以 2

5***: 样本处理过程中, 稀释了 5 倍

f: 样本加入检测体系之前的稀释倍数

m: 组织湿重, 建议 m 取 0.05 g

V_1 : 动物组织处理过程中加入试剂三的体积, 建议 V_1 取 $0.45 \times 10^{-3} \text{L}$

1***: 细胞处理时, 细胞总数 1×10^6 个

V_2 : 细胞处理过程中加入试剂三的体积, 建议 V_2 取 0.4 mL

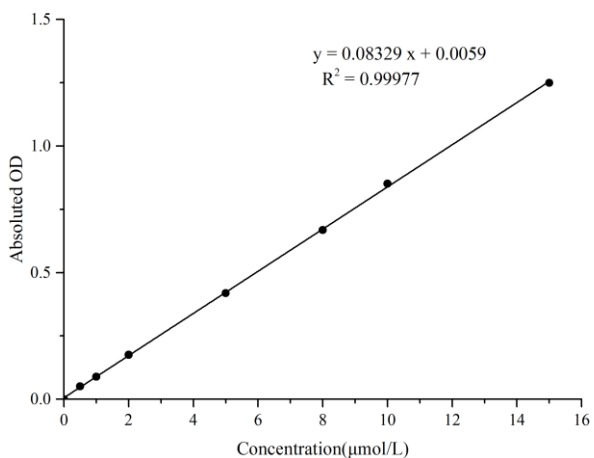
附录1 关键数据

1. 技术参数

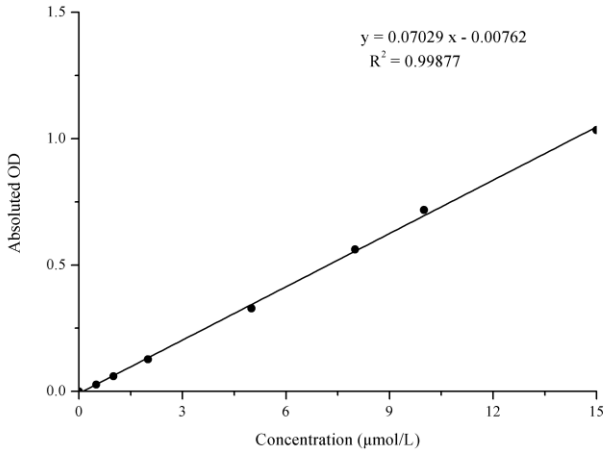
检测范围	0.36-30 $\mu\text{mol/L}$	平均批间差	3.9 %
灵敏度	0.36 $\mu\text{mol/L}$	平均批内差	0.6 %
平均回收率	97 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

总谷胱甘肽(T-GSH)标准曲线如下:



氧化型谷胱甘肽(GSSG) 标准曲线如下:



附录2 实例分析

例如检测大鼠肝脏组织(数据仅供参考):

用试剂三将10%大鼠肝脏匀浆上清稀释20倍, 取10 μL稀释后样本用于检测T-GSH含量, 结果如下:

T-GSH的标准曲线: $y = 0.0858x + 0.0064$, 测定孔OD值为1.159, 空白OD值为0.114, 计算结果为:

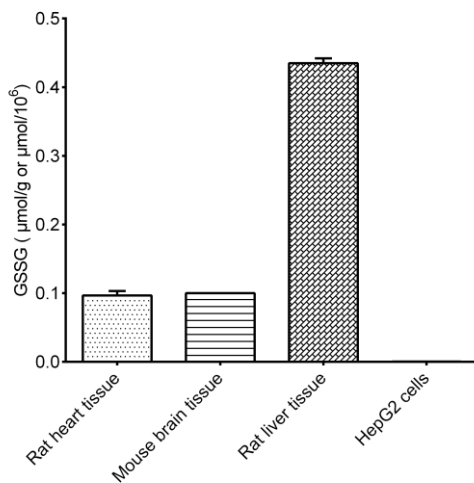
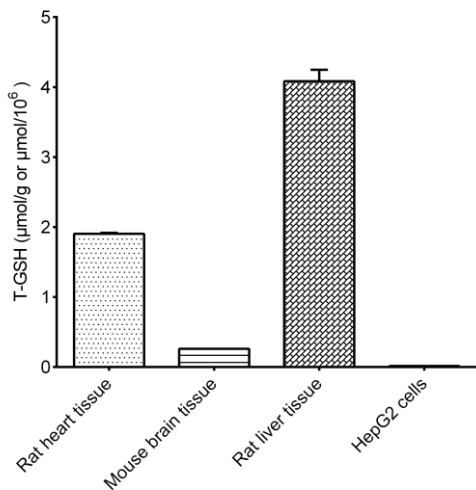
$$\text{T-GSH} (\mu\text{mol/g}) = (1.159 - 0.114 - 0.0064) \div 0.0858 \times 2 \div 0.05 \times 0.45 \times 10^{-3} \times 20 = 4.36 \mu\text{mol/g}$$

用试剂三将10%大鼠肝脏匀浆上清稀释20倍, 取100 μL稀释后样本, 按照操作步骤中氧化型谷胱甘肽测定进行检测, 结果如下:

GSSG的标准曲线: $y = 0.0717x - 0.007$, 测定孔OD值为0.320, 空白OD值为0.118, 计算结果为:

$$\text{GSSG} (\mu\text{mol/g}) = (0.320 - 0.118 + 0.007) \div 0.0717 \div 0.05 \times 0.45 \times 10^{-3} \times 20 = 0.52 \mu\text{mol/g}$$

按照说明书操作，测定10%大鼠心脏组织（稀释10倍，加样量10 μL ）、10%小鼠脑组织（稀释2倍，加样量10 μL ）、10%大鼠肝脏组织（稀释20倍，加样量10 μL ）、HepG2细胞（稀释2倍，加样量10 μL ）中T-GSH和GSSG含量。（如下图）：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本显色很低	孵育时间太短	保证充足的孵育时间
氧化型 GSSG 标曲线性差	试剂四使用前未混匀	试剂四混匀后使用
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数,重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本,重新检测
样本测量结果 T-GSH>30 $\mu\text{mol/L}$	样本浓度太高	选择合适稀释倍数,重新检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用,如将其用于临床诊断或任何其他用途,我公司将不对因此产生的问题负责,亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器,严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低,请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中,建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责,不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责,使用前请充分考虑样本可能的使用量,预留充足的样本。