(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

本测试盒适用于检测血清(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 A412 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)。

2GSH + DTNB
$$\longrightarrow$$
 GSSG + 2TNB

NADPH + H[†] + GSSG \xrightarrow{GR} NADP[†] + 2GSH

DTNB + H[‡] + NADPH \xrightarrow{GR} 2TNB + NADP[†]

提供试剂和物品

编号	名称	规格	保存方式
洲力	12 TV	(Size)(96 T)	(Storage)
试剂一	缓冲液	45 mL×2 瓶	-20°C
(Reagent 1)	(Buffer Solution)	43 IIIL^2 7A	保存6个月
试剂二	标准品	(12	-20°C
(Reagent 2)	(Standard)	6.13 mg×1 支	保存6个月
试剂三	蛋白去除剂	50 mL×2 瓶	-20°C
(Reagent 3)	(Protein Precipitator)	30 IIIL^2 7A	保存6个月
试剂四	酶储备液	80 μL×1 支	-20°C
(Reagent 4)	(Enzyme Stock Solution)	80 μL^1 X	保存6个月
试剂五	显色剂	1.5 mL×1 支	-20℃避光
(Reagent 5)	(Chromogenic Agent)	1.5 IIIL^1 X	保存6个月
试剂六	GSH 清除辅助液(GSH	2 mL×1 瓶	-20°C
(Reagent 6)	Scavenger Auxiliary Solution)	Z IIIL^I 和、	保存6个月
试剂七	GSH 清除剂	0.5 mL×1 支	-20℃避光
(Reagent 7)	(GSH Scavenger)	0.5 IIIL^1 文	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	96 孔×1 块	无要求
	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

保存24 h。

- 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°C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℃

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24h。

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°C静置5 min,3100×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℃,10000×g离心10 min,取上清置于冰上待测。

细胞样本处理:按照 10^6 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° 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,取用时要仔细缓慢。
- 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℃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℃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°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 $100 \mu L$ 样本,加入 $20 \mu L$ 的试剂六工作液,立即涡旋混匀,取出 $100 \mu L$ 于 0.5 mL EP 管中,向 EP 管中加入 $4 \mu L$ 试剂七工作液后,立即涡旋混匀, $25 \circ C$ 反应 1 h。

- 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
- ② 向①中各孔加入 150 µL 反应工作液。
- ③ 25℃或室温条件下孵育 5 min。

本). 加入到样本孔中:

- 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℃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℃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℃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:

$$T$$
-GSH 含量 $(\Delta A_1 - b_1) \div a_1 \times 2^* \times 5^{**} \times f$ $(\mu mol/L)$

GSSG 含量
(
$$\mu$$
mol/L) = ($\Delta A_2 - b_2$) $\div a_2 \times 5** \times f$

动物组织中 T-GSH、GSSG 含量:

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

$$\frac{GSSG \,\, 含量}{(\mu mol/g)} = \,\, \left(\Delta A_2 - b_2\right) \,\, \div a_2 \div \frac{m}{V_1} \times f$$

培养细胞中 T-GSH、GSSG 含量:

$$\begin{array}{ll} \text{T-GSH 含量} \\ (\mu\text{mol}/10^9) \end{array} = \hspace{0.1cm} (\Delta A_1 - b_1) \hspace{0.1cm} \div \hspace{0.1cm} a_1 \times 2^* \div \frac{1^{***}}{V_2} \times \hspace{0.1cm} f \end{array}$$

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

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

a₁: 标曲斜率 (测定 T-GSH)

b₁: 标曲截距 (测定 T-GSH)

ΔA₂: 样本测定 OD 值-空白 OD 值 (测定 GSSG)

a2: 标曲斜率 (测定 GSSG)

b2: 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0.05g

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

1***: 细胞处理时, 细胞总数 1×106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

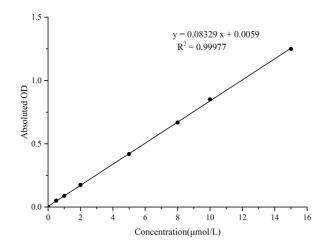
附录1 关键数据

1. 技术参数

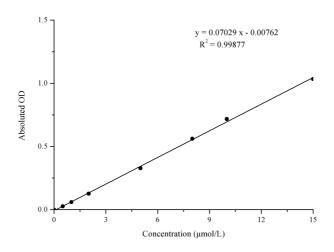
检测范围	0.36-30 μmol/L	平均批间差	3.9 %
灵敏度	0.36 μmol/L	平均批内差	0.6 %
平均回收率	97 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

总谷胱廿肽(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10μL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 = 0.0858 x + 0.0064, 测定孔OD值为1.159, 空白OD值为0.114, 计算结果为:

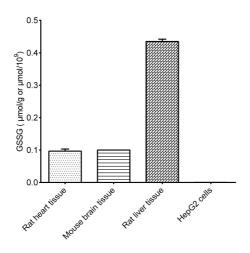
$$\frac{\text{T-GSH}}{(\mu\text{mol/g})} = (1.159 - 0.114 - 0.0064) \div 0.0858 \times 2 \div 0.05 \times 0.45 \times 10^{-3} \times 20 = 4.36 \ \mu\text{mol/g}$$

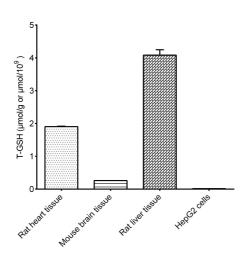
用试剂三将10%大鼠肝脏匀浆上清稀释20倍,取100 μL稀释后样本,按照操作步骤中氧化型谷胱甘肽测定进行检测,结果如下:

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

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

按照说明书操作,测定10%大鼠心脏组织(稀释10倍,加样量 $10~\mu$ L)、 10%小鼠脑组织(稀释2倍,加样量 $10~\mu$ L)、10%大鼠肝脏组织(稀释20倍,加样量 $10~\mu$ L)、HepG2细胞(稀释2倍,加样量 $10~\mu$ L)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
11 A-W/1-11 E	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 μmol/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。
- 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。
- 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。

附录4 客户发表文献

- 1. Zhang L , Shi W Y ,Jia-Ying XuYan LiuShi-Jia WangJia-Yang ZhengYun-Hong LiLin-Xi YuanLi-Qiang Qin.Protective effects and mechanism of chemical- and plant-based selenocystine against cadmium-induced liver damage[J].Journal of Hazardous Materials, 2024, 468(Apr.15):133812.1-133812.12.DOI:10.1016/j.jhazmat.2024.133812.
- Zhou Y , She R , Mei Z ,et al.Crosstalk between ferroptosis and necroptosis in cerebral ischemia/reperfusion injury and Naotaifang formula exerts neuroprotective effect via HSP90-GCN2-ATF4 pathway[J].Phytomedicine, 2024, 130(000):20.DOI:10.1016/j.phymed.2024.155399.
- 3. Agnihotri P, Malik S, Saquib M, et al. Exploring the impact of 2-hydroxyestradiol on heme oxygenase-1 to combat oxidative stress in rheumatoid arthritis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 283. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2024.137935.
- 4. Zhang Y , Feng R , Li H ,et al.CXCR4 influences PUFA desaturation and oxidative stress injury in experimental prostatitis mice by activating Fads2 via PPAR γ [J].Free Radical Biology & Medicine, 2024, 223(000):13.DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2024.07.015.
- 5. Y.-F. L, M.-Y. C, Chen Y, et al.DHMBA, a molecule from Pacific oyster (Crassostrea gigas) alleviates AD pathology by inhibiting ubiquination of Nrf2[J].Food Bioscience, 2024:62.DOI:10.1016/j.fbio.2024.105259.