（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-S

产品规格：50 assays(48 samples)/100 assays(96 samples)

检测仪器：紫外-可见光分光光度计(412 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 A_{412}(波长在 412 nm 处时的吸光度值)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。

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

$$NADPH + H^+ + GSSG \xrightarrow{GR} NADP^+ + 2GSH$$

$$DTNB + H^+ + NADPH \xrightarrow[GSSG/GSH]{GR} 2TNB + NADP^+$$

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1) (50 assays)	规格 2 (Size 2) (100 assays)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	55 mL×2 瓶	55 mL×3 瓶	2-8°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	GSSG 标准品 (GSSG Standard)	6.13 mg ×1 支	6.13 mg ×1 支	-20°C 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	蛋白去除剂 (Protein Precipitator)	60 mL×1 瓶	60 mL×2 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	酶储备液 (Enzyme Stock Solution)	77 μL×1 支	154 μL×1 支	-20°C 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	显色剂 (Chromogenic Agent)	1.5 mL×1 支	3 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	GSH 清除辅助液 (GSH Scavenger Auxiliary Solution)	0.7 mL×1 支	1.4 mL×1 支	2-8°C 保存 6 个月
试剂七	GSH 清除剂	0.1 mL×1 支	0.2 mL×1 支	-20°C 避光

(Reagent 7)	(GSH Scavenger)			保存 6 个月
试剂八 (Reagent 8)	底物 (Substrate)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂九 (Reagent 9)	终止液 (Stop Solution)	25 mL×1 瓶	50 mL×1 瓶	2-8°C 保存 6 个月

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。

所需自备物品

仪器：紫外-可见光分光光度计(412 nm)、涡旋混匀仪、恒温箱、离心机。

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

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溶解，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 8 μmol/L GSSG标准品：

按照1 mmol/L标准品储备液：试剂三=1: 124的体积比例配制，混匀，2-8°C可保存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，混匀，2-8°C可保存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的体积比例配制，混匀，2-8°C可保存24 h。

⑥ 试剂七工作液的配制：

按照试剂七：无水乙醇=1: 9体积比例配制，混匀，2-8°C可保存24 h。

⑦ 试剂八储备液的配制：

取150 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°C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的体积比例配制，混匀，2-8°C可保存24 h。

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、红细胞样本上清：

将收集好的血浆，按照血浆：试剂三=1:4 的体积比例混匀(100 μL 样本，加入 400 μL 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。

动物组织样本上清：

按照重量(g)：体积(mL)=1:9 的比例加入试剂三，进行匀浆，4°C，10000×g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

细胞样本上清：

按照 10^6 个细胞加入 400 μL 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 × 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，需选择预期差异大的2-3个样本，稀释成不同浓度进行预实验，结合检测范围0.12-30 μM，不同样本稀释比例如下表(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%大鼠心脏组织	10	人血清	不稀释
10%大鼠肝脏组织	60	大鼠血浆	不稀释
10%大鼠脑组织	10	小鼠血清	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 空白管：取 40 μL 试剂三，加入到 2 mL EP 管中；
标准管：取 40 μL 的 8 μM GSSG 标准品 ，加入到 2 mL EP 管中；
测定管：取 40 μL 的样本上清，加入到 2 mL EP 管中；

② 向①中各管加入 600 μL 反应工作液。

③ 25°C 或室温条件下孵育 5 min。

④ 向③中各管加入 200 μL 试剂八工作液。

⑤ 涡旋混匀 3 s，25°C 或室温条件下孵育 25 min。

⑥ 向⑤中各管加入 400 μL 试剂九。

⑦ 涡旋混匀 3 s，分光光度计 412 nm 处，0.5 cm 光径石英比色皿，双蒸水调零，测定各管 OD 值。

氧化型谷胱甘肽测定：

A 液：按照每 100 μL 试剂三，加入 20 μL 的试剂六工作液，立即涡旋混匀 5 s，取出 100 μL 于 0.5 mL EP 管中，向 EP 中加入 4 μL 试剂七工作液后，立即涡旋混匀 5 s，25°C 或室温条件下反应 1h。

B 液：按照每 100 μL 8 μM 的标准品，加入 20 μL 的试剂六工作液，立即涡旋混匀 5 s，取出 100 μL 于 0.5 mL EP 管中，向 EP 中加入 4 μL 试剂七工作液后，立即涡旋混匀 5 s，25°C 或室温条件下反应 1h。

C 液：取经过试剂三处理好的样本上清，按照每 100 μL 样本上清，加入 20 μL 的试剂六工作液，立即涡旋混匀 5 s，取出 100 μL 于 0.5 mL EP 管中，向 EP 中加入 4 μL 试剂七工作液后，立即涡旋混匀 5 s，25°C 或室温条件下反应 1h。

① 空白管：取 40 μL 空白 A 液，加入到 2 mL EP 管中；
标准管：取 40 μL 标准品 B 液，加入到 2 mL EP 管中；
样本管：取 40 μL 样本上清 C 液，加入到 2 mL EP 管中；

② 向①中各管加入 600 μL 反应工作液。

③ 25°C 或室温条件下孵育 5 min。

④ 向③中各管加入 200 μL 试剂八工作液。

⑤ 涡旋混匀 5 s，25°C 或室温条件下孵育 25 min。

⑥ 向⑤中各管加入 400 μL 试剂九。

⑦ 涡旋混匀 3 s，分光光度计 412 nm 处，0.5 cm 光径石英比色皿，双蒸水调零，测定各管 OD 值。

操作表

总谷胱甘肽测定：

	空白管	标准管	测定管
试剂三(μL)	40	--	--
标准品(μL)	--	40	--
样本上清(μL)	--	--	40
反应工作液(μL)	600	600	600
25°C 或室温孵育 5 min			
试剂八工作液(μL)	200	200	200
涡旋混匀 3 s，25°C 或室温条件下孵育 25 min。			
试剂九(μL)	400	400	400
涡旋混匀 3 s，分光光度计 412 nm 处，0.5 cm 光径石英比色皿，双蒸水调零，测定各管 OD 值。			

氧化型谷胱甘肽测定：

	空白管	标准管	测定管
A 液(μL)	40	--	--
B 液(μL)	--	40	--
C 液(μL)	--	--	40
反应工作液(μL)	600	600	600
25°C 或室温孵育 5 min			
试剂八工作液(μL)	200	200	200
涡旋混匀 3 s，25°C 或室温条件下孵育 25 min。			

试剂九(μL)	400	400	400
涡旋混匀 3 s，分光光度计 412 nm 处，0.5 cm 光径石英比色皿，双蒸水调零，测定各管 OD 值。			

结果计算

血清(浆)、全血、红细胞中 T-GSH、GSSG 含量：

$$\text{T-GSH 含量 (μmol/L)} = \frac{A_1 - A_0}{A_2 - A_0} \times c_1 \times 5^* \times f_1$$

$$\text{GSSG 含量 (μmol/L)} = \frac{A_4 - A_3}{A_5 - A_3} \times c_2 \times 5^* \times f_2$$

注解：

A_0：T-GSH 空白 OD 值

A_1：T-GSH 测定 OD 值

A_2：T-GSH 标准品 OD 值

A_3：GSSG 空白 OD 值

A_4：GSSG 测定 OD 值

A_5：GSSG 标准品 OD 值

c_1：16 μmol/L (GSSG 作为标准品换算成 GSH 时需乘以 2)

c_2：8 μmol/L GSSG 标准品

*：样本处理过程中被稀释倍数(5 倍)

f_1：测定 T-GSH 时血清(浆)等上清，加入检测体系前的稀释倍数

f_2：测定 GSSG 时血清(浆)等上清，加入检测体系前的稀释倍数

动物组织中 T-GSH、GSSG 含量：

$$\text{T-GSH 含量 (μmol/kg)} = \frac{A_1 - A_0}{A_2 - A_0} \times c_1 \div \frac{m}{V_1} \times f_3$$

$$\text{GSSG 含量 (μmol/kg)} = \frac{A_4 - A_3}{A_5 - A_3} \times c_2 \div \frac{m}{V_1} \times f_4$$

注解：

A_0：T-GSH 空白 OD 值

A_1：T-GSH 测定 OD 值

A_2：T-GSH 标准品 OD 值

A_3：GSSG 空白 OD 值

A_4：GSSG 测定 OD 值

A_5：GSSG 标准品 OD 值

c_1：16 μmol/L (GSSG 作为标准品换算成 GSH 时需乘以 2)

c_2：8 μmol/L GSSG 标准品

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 mL

f_3：测定 T-GSH 时动物组织上清，加入检测体系前的稀释倍数

f_4：测定 GSSG 时动物组织上清，加入检测体系前的稀释倍数

培养细胞中 T-GSH、GSSG 含量：

$$\text{T-GSH 含量 } (\mu mol/10^9) = \frac{A_1 - A_0}{A_2 - A_0} \times c_1 \div \frac{n^{**}}{V_2} \times f_5$$

$$\text{GSSG 含量 } (\mu mol/10^9) = \frac{A_4 - A_3}{A_5 - A_3} \times c_2 \div \frac{n^{**}}{V_2} \times f_6$$

注解：

A_0：T-GSH 空白 OD 值

A_1：T-GSH 测定 OD 值

A_2：T-GSH 标准品 OD 值

A_3：GSSG 空白 OD 值

A_4：GSSG 测定 OD 值

A_5：GSSG 标准品 OD 值

c_1：16 μmol/L (GSSG 作为标准品换算成 GSH 时需乘以 2)

c_2：8 μmol/L GSSG 标准品

**：当加入细胞为 1×10^6 个时，n=1

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

f_5：测定 T-GSH 时细胞样本上清，加入检测体系前的稀释倍数

f_6：测定 GSSG 时细胞样本上清，加入检测体系前的稀释倍数

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

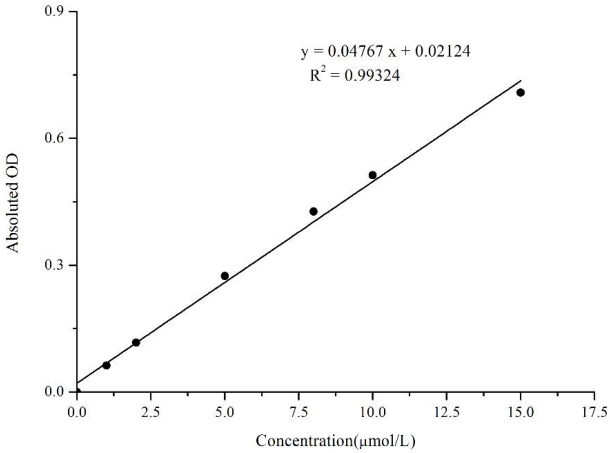
附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	0.12-30 μmol/L	**平均批间差**	4.7%
灵敏度	0.12 μmol/L	**平均批内差**	0.9%
平均回收率	97%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 标准曲线(如下图):



附录2 实例分析

例如检测小鼠肝脏组织(数据仅供参考)：

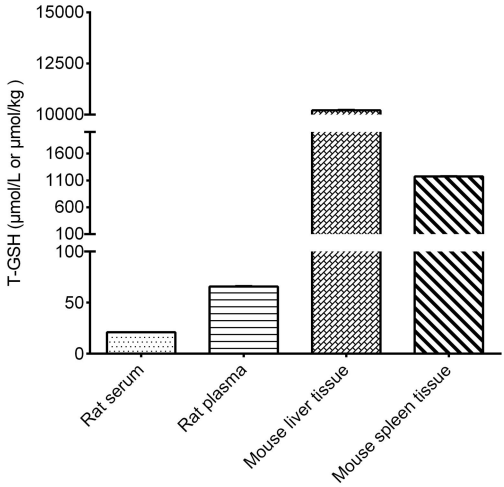
用试剂三将10%小鼠肝脏组织匀浆上清稀释60倍，取40 μL稀释后样本用于检测T-GSH含量；空白管平均OD值为0.022，标准管平均OD值为0.354，测定管平均OD值为0.414结果如下：

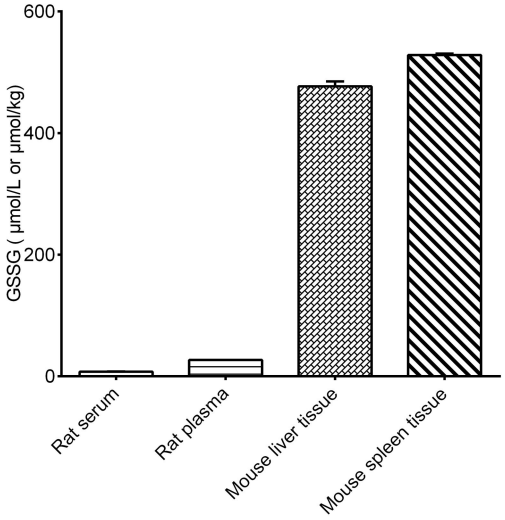
$$\text{T-GSH (μmol/kg)} = \frac{(0.414-0.022)}{(0.354-0.022)} \times 16 \times 60 \div 0.05 \times 0.45 = 10201.45\ \text{μmol/kg}$$

用试剂三将10%小鼠肝脏组织匀浆上清稀释60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，空白管平均OD值为0.025，标准管平均OD值为0.330，测定管平均OD值为0.059，计算结果为：

$$\text{GSSG (μmol/kg)} = \frac{(0.059-0.025)}{(0.330-0.025)} \times 8 \times 60 \div 0.05 \times 0.45 = 481.57\ \text{μmol/kg}$$

按照说明书操作，测定大鼠血清(加样量40 μL)、大鼠血浆(加样量40 μL)、10%小鼠肝组织(稀释60倍，加样量40 μL)、10%小鼠脾组织(稀释10倍，加样量40 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 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。
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。

附录4 客户发表文献

1. Du S, Zhou N, Xie G, et al. Surface-engineered triboelectric nanogenerator patches with drug loading and electrical stimulation capabilities: Toward promoting infected wounds healing[J]. Nano Energy, 2021, 85:106004. IF:17.087
2. Bartolini D, Arato I, Mancuso F, et al. Melatonin modulates Nrf2 activity to protect porcine pre-pubertal Sertoli cells from the abnormal H_2O_2 generation and reductive stress effects of cadmium. J Pineal Res. 2022;73 (1):e12806. IF:13.007
3. Yang Z, Wang J, Ai S, et al. Self-generating oxygen enhanced mitochondrion-targeted photodynamic therapy for tumor treatment with hypoxia scavenging[J]. Theranostics, 2019, 9(23): 6809. IF:11.556
4. Wan Q, Cao R, Wen G, et al. Sequential use of UV-LEDs irradiation and chlorine to disinfect waterborne fungal spores: Efficiency, mechanism and photoreactivation[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 423:127102-. IF:10.588
5. Tian J, Wang L, Hui S, et al. Cadmium accumulation regulated by a rice heavy-metal importer is harmful for host plant and leaf bacteria. J Adv Res. 2022. IF:10.479
6. Jg A, Jie S B, Jy B, et al. Comparative toxicity reduction potential of UV/sodium percarbonate and UV/hydrogen peroxide treatments for bisphenol A in water: An integrated analysis using chemical, computational, biological, and metabolomic approaches[J]. Water Research, 2020, 190. IF:9.702
7. Yang X X, Xu X, Wang M F, et al. A nanoreactor boosts chemodynamic therapy and ferroptosis for synergistic cancer therapy using molecular amplifier dihydroartemisinin[J]. Journal of Nanobiotechnology, 2022, 20(1):1-19. IF:9.464
8. Liu Z, Liu X, Yang Q, et al. Neutrophil membrane-enveloped nanoparticles for the amelioration of renal ischemia-reperfusion injury in mice[J]. Acta Biomaterialia, 2020, 104: 158-166. IF:8.947
9. Huang S, Le H, Hong G, et al. An all-in-one biomimetic iron-small interfering RNA nanoplatform induces ferroptosis for cancer therapy. Acta Biomater. 2022;148:244-257. IF:8.291
10. Alharbi YM, Sakr SS, Albarrak SM, et al. Antioxidative, Antidiabetic, and Hypolipidemic Properties of Probiotic-Enriched Fermented Camel Milk Combined with Salvia officinalis Leaves Hydroalcoholic Extract in Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. Antioxidants (Basel). 2022;11 (4):. IF:7.675

11. Wang H, Huang Q, Zhang Z, et al. Transient post-operative overexpression of CXCR2 on monocytes of traumatic brain injury patients drives monocyte chemotaxis toward cerebrospinal fluid and enhances monocyte-mediated immunogenic cell death of neurons in vitro[J]. Journal of Neuroinflammation, 2022. IF:7.573
12. Liu P, Yin Z, Chen M, et al. Cytotoxicity of adducts formed between quercetin and methylglyoxal in PC-12 cells[J]. Food Chemistry, 2021, 352(2):129424. IF:7.514
13. Adhikari B, Adhikari M, Ghimire B, et al. Cold plasma seed priming modulates growth, redox homeostasis and stress response by inducing reactive species in tomato (Solanum lycopersicum)[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2020, 156: 57-69. IF:7.376
14. Zhao X, Wang C,Dai S, et al. Quercetin Protects Ethanol-Induced Hepatocyte Pyroptosis via Scavenging Mitochondrial ROS and Promoting PGC-1 α -Regulated Mitochondrial Homeostasis in L02 Cells. Oxid Med Cell Longev. 2022;2022:4591134. IF:7.31
15. Chagas TQ, Freitas ÍN, Montalvão MF, Nobrega RH, Machado MRF, Charlie-Silva I, Araújo APDC, Guimarães ATB, Alvarez TGDS, Malafaia G. Multiple endpoints of polylactic acid biomicroplastic toxicity in adult zebrafish (Danio rerio)[J]. Chemosphere. 2021 Aug;277:130279. IF:7.086
16. Mlindeli Gamede, Lindokuhle Mabuza, Phikelelani Ngubane, et al. Preventing the onset of diabetes-induced chronic kidney disease during prediabetes: The effects of oleanolic acid on selected markers of chronic kidney disease in a diet-induced prediabetic rat model[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy.2021 Jul;139:111570. IF:6.529
17. Yang H, Zhu Y, Ye Y, et al. Nitric oxide protects against cochlear hair cell damage and noise-induced hearing loss through glucose metabolic reprogramming.[J]. Free radical biology & medicine, 2021. IF:6.525
18. Rao M J, Xu Y, Tang X, et al. CsCYT75B1, a Citrus CYTOCHROME P450 Gene, Is Involved in Accumulation of Antioxidant Flavonoids and Induces Drought Tolerance in Transgenic Arabidopsis[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2020, 9(2):161. IF:6.313
19. Liou G G, Hsieh C C, Lee Y J, et al. N-Acetyl Cysteine Overdose Inducing Hepatic Steatosis and Systemic Inflammation in Both Propacetamol-Induced Hepatotoxic and Normal Mice[J]. Antioxidants, 2021, 10(3):442. IF:6.312
20. Wang Y, Chi H, Xu F, et al. Cadmium chloride-induced apoptosis of HK-2 cells via interfering with mitochondrial respiratory chain[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2022, 236:113494-. IF:6.233