



氧化型/还原型谷胱甘肽检测试剂盒

包装清单

Cat No.	组分	包装规格-100T
MCK-0026	酶溶液 (Enzyme Solution)	20 U
	辅酶 (Coenzyme)	4.4 mg
	底物 (DTNB) (Substrate (DTNB))	4.4 mg
	GSH 标样 (Standard GSH)	0.123 mg
	GSSG 标样 (Standard GSSG)	0.123 mg
	掩蔽剂 (Masking Solution)	3.3 mg
	淬灭剂 (Quenching Solution)	0.57 mg
	蛋白去除试剂 (Extraction Buffer)	15 mL
	缓冲液 (Buffer Solution)	30 mL
	说明书	1 份

产品简介

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

默科的 GSH/GSSG 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-nitrobenzoic 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 412 nm 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型谷胱甘肽 (GSSG)，先使用 1-甲基-2-乙烯基吡啶鎓三氯酸盐作为清除剂清除所有现有的谷胱甘肽再进行检测。该检测方法的线性检测范围为 0.1-3 μ M GSH，检测下限为 10 nM GSH。

默科的氧化型/还原型谷胱甘肽检测试剂盒适用于定量检测全血、血浆、血清、尿液以及组织和细胞提取物中的还原型和氧化型谷胱甘肽 (GSH/GSSG)。100 T 至少可以检测 100 个样品。

保存条件

-20°C 保存，有效期 1 年。拆封后 -20°C 保存，有效期 2 个月。避免反复冻融。

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、 β -巯基乙醇、半胱氨酸还原剂或马来酰亚胺化合物会严重干扰谷胱甘肽的测定，请尽量避免。
2. 如果测定吸光值超过线性范围吸光值，可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。
3. 一定要严格控制反应时的温度和反应时间，否则每次都需做标准曲线。
4. 底物、酶/辅酶工作液不太稳定，要严格按照后续说明操作，谨防失活。
5. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
6. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明

试剂准备

1. 底物工作液：

每管底物 (DTNB) 用 264 μ L DMSO 溶解配制底物储备液 (25 $\times$)。用缓冲液稀释 25 倍即可获得底物工作液。每个样品或标样需 60 μ L 底物工作液，可根据样品数量制备适当体积的底物工作液。**注：**①底物工作液不稳定，需现配现用。96 孔板每孔需 60 μ L。②储备液 -20°C 可以存 2 个月，避免反复冻融。

2. 酶/辅酶工作液：

- (1) 每管酶加入 1.1 mL 缓冲液溶解配制酶工作液。
- (2) 每管辅酶用 1.1 mL 缓冲液溶解配制辅酶工作液。
- (3) 将酶工作液与辅酶工作液转移至 15 mL 离心管中混合，再加入 4.4 mL 缓冲液配制酶/辅酶工作液。每个样品或标样需 60 μ L 酶/辅酶工作液，可根据样品数量制备适当体积的酶/辅酶工作液。

注：①酶工作液、辅酶工作液 -20°C 可保存 2 个月。②酶/辅酶工作液不稳定，需现配现用。

Website URL: www.mo-chem.com

生产商：上海拜立得生物科技有限公司

**3. GSH 标准溶液(400 μ M):**

每管 GSH 标样中加入 1 mL 蛋白去除试剂配制成 400 μ M GSH 标准溶液。

注: GSH 标准溶液 -20 $^{\circ}$ C 可保存 2 个月。

4. GSSG 标准溶液(200 μ M):

每管 GSSG 标样中加入 1 mL 蛋白去除试剂配制成 200 μ M GSSG 标准溶液。

注: GSSG 标准溶液 -20 $^{\circ}$ C 可保存 2 个月。

5. 掩蔽剂: 每管掩蔽剂中加入 2.2 mL 缓冲液配制成掩蔽剂储液。

注: 掩蔽剂储液 -20 $^{\circ}$ C 可保存 2 个月。

6. 淬灭剂: 每管淬灭剂加入 0.55 mL 缓冲液配制成淬灭剂储液。

注: 淬灭剂储液 -20 $^{\circ}$ C 可保存 2 个月。

待测样品准备**1. 组织样品:**

(1) 组织样品剪碎后用液氮速冻然后研磨成粉末。每 10 mg 组织粉末加入 100 μ L 蛋白去除试剂, 充分混匀并用玻璃匀浆仪充分匀浆, 4 $^{\circ}$ C 孵育 10 min。

注: 对于比较容易匀浆的组织可跳过液氮速冻直接匀浆。

(2) 4 $^{\circ}$ C, 10,000 g 离心 10 min, 取上清即为待测样品。

注: 样品立即用于检测可置于 4 $^{\circ}$ C 暂存, 短期内不进行检测可置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 但不宜超过一周。

2. 细胞样品:

(1) 收集细胞并用 PBS 洗涤一次。

注: 尽量使用新鲜细胞进行测定, 冷冻细胞测定数据不准确。

(2) 加入 3-5 倍细胞沉淀体积的蛋白去除试剂, 充分混匀。超声裂解细胞, 4 $^{\circ}$ C, 10,000 g 离心 10 min, 取上清即为待测样品。**注:** ①样品裂解后需立即转移至冰上, 以防 GSH 在空气中氧化成 GSSG。②样品立即用于检测可置于 4 $^{\circ}$ C 暂存, 短期内不进行检测可置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 但不宜超过一周。

3. 细胞或血浆:

(1) 新鲜血液 600 g 离心 10 min, 沉淀即为红细胞, 上清则为血浆。

(2) 红细胞: 用 PBS 洗涤两次。取 50 μ L 红细胞沉淀, 加入 50 μ L 蛋白去除试剂, 4 $^{\circ}$ C 或冰浴充分混匀。超声裂解细胞, 4 $^{\circ}$ C, 10,000 g 离心 10 min, 取上清即为待测样品。

(3) 血浆: 血液分离后的上清即为待测样品。

样品中总谷胱甘肽 (GSH + GSSG) 测定**1. GSH 标准样品准备:**

(1) 取 25 μ L GSH 标准溶液 (400 μ M), 加入 175 μ L 蛋白去除试剂, 混匀即为 50 μ M GSH 标准样品溶液。

(2) 用蛋白去除试剂梯度稀释 GSH 标准样品溶液至终浓度为 50 μ M、25 μ M、12.5 μ M、6.25 μ M、3.13 μ M、1.57 μ M、0 Mm。**注:** 梯度稀释操作为 100 μ L 上一浓度标准样品溶液+ 100 μ L 蛋白去除试剂。

(3) 在上述不同浓度的 100 μ L GSH 标准样品溶液中加入 20 μ L 缓冲液, 混匀。

2. 待测样品准备: 25 μ L 样品中加入 50 μ L 蛋白去除试剂和 15 μ L 缓冲液, 涡旋混匀, 即为待测样品管。

注: ①样品中总谷胱甘肽浓度较高, 此处对原始样品进行 3 倍稀释, 最终计算时需折算回来。②15 μ L 缓冲液添加是为了保证样品和标样进行相同稀释操作。

3. 标样检测及标准曲线制作:

(1) 96 孔板中, 每孔加入 20 μ L 标样、65 μ L 缓冲液, 37 $^{\circ}$ C 震荡孵育 10 min 或室温震荡孵育 30 min。

注: ①盖上盖子以防止溶液在孵育过程中蒸发。②建议每个样本重复做 3 个复孔, 以获得更准确的数据。

(2) 每孔加入 60 μ L 底物工作液、60 μ L 酶/辅酶工作液。

(3) 加入酶/辅酶工作液后反应立即开始, 用酶标仪测 412 nm 处吸光度。

注: ①建议选择 Kinetic 法测定, 每 25 s 测一次, 共 15-20 次。②使用多通道移液器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. 待测样品检测:

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

注: ①盖上盖子以防止溶液在孵育过程中蒸发。②建议每个样本重复做 3 个复孔, 以获得更准确的数据。

(2) 每孔加 60 μ L 底物工作液、60 μ L 酶/辅酶工作液。

(3) 加入酶/辅酶工作液后反应立即开始, 用酶标仪测定 412 nm 处吸光度。

注: ①建议选择 Kinetic 法测定, 每 25 s 测一次, 共 15-20 次。②使用多通道移液器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总谷胱甘肽(GSH + GSSG) 含量。

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

样品中氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 测定**1. GSSG 标准样品准备:**



- (1) 取 25 μL GSSG 标准溶液 (200 μM)，加入 175 μL 蛋白去除试剂，混匀即为 25 μM GSSG 标准样品溶液。
- (2) 用蛋白去除试剂梯度稀释 GSSG 标准样品溶液至终浓度为 25 μM 、12.5 μM 、6.25 μM 、3.13 μM 、1.57 μM 、0.785 μM 、0 μM 。

注：梯度稀释操作为 100 μL 上一浓度标准样品溶液+ 100 μL 蛋白去除试剂。

- (3) 在上述不同浓度的 100 μL GSSG 标注样品溶液中加入 20 μL 掩蔽剂，混匀。

2. 待测样品准备：

75 μL 样品中加入 15 μL 掩蔽剂，涡旋混匀，室温孵育 > 5 min 即为待测样品管。

注：15 μL 掩蔽剂添加是为了封闭样品中的 GSH。

3. 标样检测及标准曲线制作：

- (1) 96 孔板中，每孔加入 20 μL 稀释后的标样、60 μL 缓冲液、5 μL 淬灭剂，37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡孵育 10 min 或室温震荡孵育 30 min

注：① 盖上盖子以防止溶液在孵育过程中蒸发。② 建议每个样本重复做 3 个复孔，以获得更准确的数据。

- (2) 每孔加入 60 μL 底物工作液、60 μL 酶/辅酶工作液。

- (3) 加入酶/辅酶工作液后反应立即开始，用酶标仪测定 412 nm 处吸光度。

注：① 建议选择 Kinetic 法测定，每 25 s 测一次，共 15-20 次。② 使用多通道移液器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. 待测样品检测：

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

注：① 盖上盖子以防止溶液在孵育过程中蒸发。② 建议每个样本重复做 3 个复孔，以获得更准确的数据。

- (2) 每孔加入 60 μL 底物工作液、60 μL 酶/辅酶工作液。

- (3) 加入酶/辅酶工作液后反应立即开始，用酶标仪测定 412 nm 处吸光度。

注：① 建议选择 Kinetic 法测定，每 25 s 测一次，共 15-20 次。② 使用多通道移液器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) 含量。

注：还原型谷胱甘肽 (GSH) 可根据总谷胱甘肽含量 (GSH + GSSG) 与氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 含量来计算：还原型谷胱甘肽 (GSH) = 总谷胱甘肽 (GSH + GSSG) - 氧化型谷胱甘肽 (GSSG) $\times$ 2。