



总谷胱甘肽检测试剂盒

包装清单

Cat No.	组分	包装规格-100T
MCK-0039	总谷胱甘肽检测缓冲液	60mL
	谷胱甘肽还原酶	150μL
	还原型谷胱甘肽(GSH)	4.5mg
	DTNB	4.5mg
	蛋白去除试剂 S	0.4g
	NADPH	4mg
	DMSO	1.5mL
	说明书	1 份

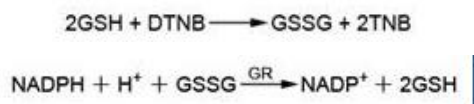
产品简介

总谷胱甘肽检测试剂盒(Total Glutathione Assay Kit)是一种简单易行的检测总谷胱甘肽(GSSG+GSH)的试剂盒。

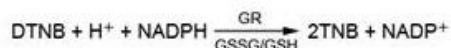
谷胱甘肽(glutathione)是一种由 3 个氨基酸残基组成的小肽, 全称为谷氨酰-半胱氨酰-甘氨酸, 英文名称为 glutamyl-cysteinyl-glycine, 简称为 glutathione。由于半胱氨酸上的巯基(SH)为谷胱甘肽的活性基团, 所以常简称为 G-SH 或 GSH。谷胱甘肽包括还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, 常称为 GSH)和氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione disulfide)两种形式。由于氧化型谷胱甘肽是由两个 GSH 通过巯基脱氢而成, 所以常简称为 G-S-S-G 或 GSSG。还原型谷胱甘肽是绝大多数活细胞中巯基的主要来源, 对于维持蛋白质中巯基适当的氧化还原状态有重要作用, 并且是动物细胞中关键的抗氧化剂。总谷胱甘肽中通常 90-95%为还原型谷胱甘肽。

通过谷胱甘肽还原酶把氧化型谷胱甘肽(GSSG)还原成还原型谷胱甘肽(GSH), 而 GSH 可以和生色底物 DTNB 反应产生黄色的 TNB 和 GSSG。适当配制反应体系, 前后两个反应合并起来后, 总谷胱甘肽(GSSG+GSH)就相当于一个颜色产生的限速因素, 总谷胱甘肽的量就决定了黄色的 TNB 形成量。从而通过测定 A412 就可以计算出总谷胱甘肽的量。

本试剂盒的具体反应原理如下:



两个反应相合并:



本试剂盒可以检测动物组织、血浆、红细胞、和培养细胞或其它适当样品中总谷胱甘肽的含量。

本试剂盒提供了蛋白去除试剂 S, 可以更加准确地测定出含有蛋白的样品中的总谷胱甘肽的量。

本试剂盒的检测下限为 1μM。一个试剂盒共可以进行 100 次检测。

保存条件

-20℃ 保存, 有效期 1 年。

还原型谷胱甘肽配制成溶液后, 需适当分装, -20℃ 保存, 有效期 3 个月。

DTNB 溶解在 DMSO 中后, 需适当分装, -20℃ 保存, 有效期 3 个月。

蛋白去除试剂 S 配制成溶液后可以 4℃ 保存。NADPH 溶解后, 适当分装, -70℃ 保存。

注意事项

1. 本试剂盒检测时牵涉到氧化还原反应, 所有氧化剂或还原剂都会干扰本试剂盒的测定。特别是 DTT、巯基乙醇等含有巯基的试剂会严重干扰本试剂盒的测定, 请尽量避免。
2. 一定要严格控制反应时的温度和反应时间, 否则需每次都做标准曲线。
3. NADPH 等试剂不太稳定, 要严格按照后续说明操作, 谨防失活。
4. DMSO 在 4℃、冰浴等较低温度情况下会凝固, 可以 20-25℃ 水浴温育片刻至全部融解后使用。
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

1. 试剂盒的准备工作

(1) GSH 储备液的配制: 在本试剂盒提供的 4.5mg GSH 中加入 1.5mL Milli-Q 级纯水, 溶解并混匀, 即为 GSH 储备液, 浓度为 10mM。除立即待用部分外, 其余 GSH 储备液适当分装后-20℃保存。

(2) DTNB 储备液的配制: 在本试剂盒提供的 4.5mg DTNB 中加入 1.5mL 本试剂盒提供的 DMSO, 溶解并混匀, 即为 DTNB 储备液。除立即待用部分外, 其余 DTNB 储备液适当分装后-20℃保存。

(3) 蛋白去除试剂 S 溶液的配制: 在本试剂盒提供的 0.4 克蛋白去除试剂 S 中加入 8mL Milli-Q 级纯水, 配制成 8mL 5%的水溶液, 4℃保存。

(4) NADPH 储备液(40mg/mL)的配制: 在本试剂盒提供的 4mg NADPH 中加入 100μL Milli-Q 级纯水, 溶解并混匀, 即为 NADPH 储备液。除立即待用部分外, 其余 NADPH 储备液适当分装后-70℃保存。

(5) 5 倍稀释谷胱甘肽还原酶的配制: 取 50 微升谷胱甘肽还原酶, 加入 200μL 总谷胱甘肽检测缓冲液, 混匀, 即成 5 倍稀释的谷胱甘肽还原酶。

(6) 总谷胱甘肽检测工作液的配制: 根据待检测的样品数参考下表配制适当量的总谷胱甘肽检测工作液, 表中三种试剂按比例混合后即总谷胱甘肽检测工作液。

组分	1 个样品	10 个样品	20 个样品
5 倍稀释谷胱甘肽还原酶	6.6 μL	66 μL	132 μL
DTNB 储备液	6.6 μL	66 μL	132 μL
总谷胱甘肽检测缓冲液	150 μL	1.5 mL	3 mL

(7) 0.5mg/mL NADPH 的配制: 取 10μL NADPH 储备液, 加入 790μL 总谷胱甘肽检测缓冲液, 混匀即为 0.5mg/mL NADPH。每检测一个样品需 50μL 0.5mg/mL NADPH。

2. 标准品的准备

把 10mM GSH 储备液用蛋白去除试剂 S 溶液稀释成 50μM GSH 溶液。然后依次稀释成 25、15、10、5、2μM GSH 溶液。取 50、25、15、10、5、2μM GSH 溶液六个点做标准曲线。

注: 由于 GSH 在蛋白去除试剂 S 溶液中不太稳定, 用蛋白去除试剂 S 溶液配制的 GSH 溶液必须新鲜配制后使用, 不可冻存后再使用。

3. 样品的准备

(1) 组织样品的准备:

取组织用液氮速冻, 然后研成粉末。每 10mg 研碎的组织粉末, 加入 30μL 蛋白去除试剂 S 溶液, 充分 Vortex。再加入 70μL 蛋白去除试剂 S 溶液, 用玻璃匀浆器充分匀浆(对于比较容易匀浆的组织可以不用液氮速冻等处理, 而直接加入适量蛋白去除试剂 S 溶液进行匀浆)。4℃放置 10 分钟后, 10,000g 4℃离心 10 分钟, 取上清用于总谷胱甘肽的测定。样品需暂时 4℃保存, 不立即测定的样品可以-70℃保存, 但不宜超过 10 天。对于处理好的组织样品通常需用蛋白去除试剂 S 溶液进行适当稀释后再进行测定, 稀释倍数通常为 5-20 倍。

(2) 细胞样品的准备:

请尽量使用新鲜的细胞进行测定, 而不要使用冻存的细胞进行测定。PBS 洗涤细胞一次, 离心收集细胞, 吸尽上清。加入细胞沉淀体积 3 倍量的蛋白去除试剂 S 溶液, 即如果细胞沉淀为 10μL, 则加入 30μL 蛋白去除试剂 S 溶液, 充分 Vortex。(细胞沉淀的体积可以根据细胞沉淀的重量进行估算。收集细胞前后分别对离心管进行称重, 从而就可以计算出细胞沉淀的重量。10mg 细胞沉淀的体积可以粗略地看做 10μL。)然后利用液氮和 37℃水浴对样品进行两次快速的冻融。4℃或冰浴放置 5 分钟。4℃, 10,000g 离心 10 分钟。取上清用于总谷胱甘肽的测定。样品需暂时 4℃保存, 不立即测定的样品可以-70℃保存, 但不宜超过 10 天。对于处理好的细胞样品通常需用蛋白去除试剂 S 溶液进行适当稀释后再进行测定, 稀释倍数可以高达 20 倍。

(3) 红细胞或血浆样品的准备:

请尽量使用新鲜的血液进行测定。600g 离心 10 分钟, 沉淀为红细胞, 上清为血浆。对于红细胞, 用 PBS 洗涤两次。取约 50μL 红细胞沉淀或血浆, 加入 50μL 蛋白去除试剂 S 溶液, 充分 Vortex。4℃或冰浴放置 10 分钟。4℃, 10,000g 离心 10 分钟。取上清用于总谷胱甘肽的测定。样品需暂时 4℃保存, 不立即测定的样品可以-70℃保存, 但不宜超过 10 天。对于处理好的红细胞样品最后需用蛋白去除试剂 S 溶液稀释 10 倍后再进行后续的测定, 而对于血浆样品, 应直接取 10μL 进行测定。

(4) 对于一些谷胱甘肽含量特别低的样品, 可以通过冷冻干燥进行浓缩后再进行测定。

4. 样品和标准品的测定

(1) 参考下表, 使用 96 孔板, 依次加入样品或标准品, 混匀。加入 150μL 总谷胱甘肽检测工作液后, 混匀, 25℃或室温孵育 5 分钟。

	空白对照 (blank)	标准曲线 (standard)	样品(sample)
样品或标准品	0 μL	10 μL	x μL
蛋白去除试剂 S 溶液	10 μL	0 μL	10-x μL
总谷胱甘肽检测工作液	150 μL	150 μL	150 μL
25℃或室温孵育	5 min	5 min	5 min
0.5mg/mL NADPH	50 μL	50 μL	50 μL

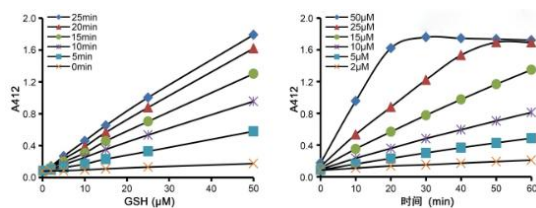
(2) 加入 50μL 0.5mg/mL NADPH 溶液, 混匀。

(3) 立即用酶标仪测定 A412, 每 5 分钟测定一次或实时测定, 共测定 25 分钟, 测得 5 个数据。(说明: 为了简化实验步骤, 可以在加入 NADPH 溶液混匀后 25 分钟, 仅测定一次 A412)。如果仪器可以设置温度, 把温度设置在 25℃, 否则就在室温状况下测定。如果酶



标仪不能测定 A412, 可以测定 405-414nm 附近范围的吸光度。如果标准曲线良好, 但样品的吸光度比较低, 可以延长孵育时间至 30-60 分钟, 标准品和样品的吸光度在一定范围内会随时间的延长接近于线性增加的。

(4) 标准品的实测效果参考下图。**注:** 图中数据仅供参考, 实际的检测效果可能会因具体反应条件的不同而有所不同。



GSH 标准曲线实测效果图

5. 样品中总谷胱甘肽含量的计算:

(1) 单点测定法: 即反应 25 分钟(或 30-60 分钟)后仅测定一次吸光度。根据不同浓度标准品测得的不同吸光度作出标准曲线。样品对照标准曲线即可计算出总谷胱甘肽的含量。实际计算出来的总谷胱甘肽的含量相当于把氧化型谷胱甘肽的含量乘以 2 再加上还原型谷胱甘肽的含量。单点法测定相对比较便捷, 而动力学法测定则相对比较精确。

(2) 动力学测定法: 先根据不同时间点测定得到的吸光度值计算出 $\Delta A_{412}/\text{min}$ 。然后以标准品的浓度为横坐标, 以 $\Delta A_{412}/\text{min}$ 为纵坐标, 做出标准曲线。根据样品的 $\Delta A_{412}/\text{min}$, 对照标准曲线就可以计算出测定时样品中总谷胱甘肽的含量。

(3) 同时根据样品的稀释倍数、以及最初样品的使用量, 可以计算出每毫克组织或细胞中的总谷胱甘肽的含量。对于细胞样品, 也可以根据最初细胞的使用数量, 然后另外取一定数量的细胞裂解后测定蛋白浓度, 从而计算出细胞样品的蛋白量, 最后计算出每毫克蛋白中总谷胱甘肽的含量。