

组织细胞还原型谷胱甘肽 GSH 和氧化性谷胱甘肽 GSSG 含量测定试剂盒

Oxidized and Reduced Glutathione Assay Kit

产品编号	产品名称	规格
E2071	Oxidized and Reduced Glutathione Assay Kit	100T

产品简介

还原型谷胱甘肽 GSH 和氧化性谷胱甘肽 GSSG 含量测定试剂盒 (Oxidized and Reduced Glutathione Assay Kit) 是一种灵敏的检测还原型和氧化性谷胱甘肽的试剂盒。谷胱甘肽包括还原型谷胱甘肽 (GSH) 和氧化型谷胱甘肽 (GSSG)。GSH 是细胞中巯基的主要来源, 对于维护蛋白巯基适当的氧化还原状态有重要作用, 动物细胞中谷胱甘肽主要是 GSH, 但是在氧化应激条件下 GSH 会被氧化为 GSSG。

GSH 可以和 DTNB 反应生成黄色的 TNB 和 GSSG, 利用该反应可以通过测定生成的 TNB 在 412nm 波长的吸光度定量检测 GSH; 另外谷胱甘肽还原酶 (Glutathione Reductase, GR) 可以将 GSSG 还原为 GSH, 在反应体系中增加 GR, 可以测定总谷胱甘肽, 并能通过酶反应将 GSSG 反复还原为 GSH, 从而极大提高 GSH 和 DTNB 显色反应对谷胱甘肽检测的灵敏度。

本试剂盒首先利用上述酶循环反应检测样品中总谷胱甘肽 T-GSH 浓度, 另外利用 GSH 掩蔽剂 (Masking Reagent) 清除样品中的 GSH, 然后利用上述酶循环反应检测样品中 GSSG 的浓度, 从而间接定量 GSH 的浓度。

本试剂盒检测 T-GSH 的线性范围为 0.312-10 μM , 灵敏度 $\leq 0.312 \mu\text{M}$ 。本试剂盒检测 GSSG 的线性范围为 0.156-5 μM , 灵敏度 $\leq 0.156 \mu\text{M}$ 。

本试剂盒能够检测动物细胞和组织中的 GSH、GSSG。

试剂盒组成

组份编号	组份名称	规格	数量	储存
E2071-1	Glutathione Assay Buffer	100 ml/瓶	1	-20°C
E2071-2	DTNB Solution	250 μl /管	1	-20°C
E2071-3	NADPH Solution	250 μl /管	1	-80°C
E2071-4	Glutathione Reductase	250 μl /管	1	-20°C
E2071-5	GSH Standard (1 mM)	100 μl /管	1	-20°C
E2071-6	GSSG Standard (0.5 mM)	100 μl /管	1	-20°C
E2071-7	Masking Reagent	120 μl /管	1	-20°C
E2071-8	Sulfosalicylic Acid	1 g/管	1	-20°C

—	说明书	份	1	
---	-----	---	---	--

需要而未提供的试剂及器材

1. 纯水
2. Triton X-100
3. 系列可调节量程移液器及吸头
4. 离心管及 96 孔板
5. 酶标仪

储存条件

干冰运输, 收到试剂盒后将试剂盒不同组分按上述温度储存, 有效期 12 个月。蛋白沉淀试剂 Sulfosalicylic Acid (SSA) 配制成溶液后 4°C 储存, 储存时间不超过 24 小时。

注意事项

1. 本试剂盒检测涉及氧化还原反应, 很多氧化剂和还原剂都会干扰试剂盒的测定, 特别是巯基乙醇、DTT 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. 在每次测定同时利用标准品制作标准曲线, 样品中谷胱甘肽浓度过低时, 可适当延长反应时间。
3. NADPH 在溶液中容易分解, 要严格按储存条件保存。
4. 初次使用试剂盒时, 小体积液体试剂请适当离心后使用。
5. 本产品仅限专业人员用于科学研究, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品。
6. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

测定前准备

1. 蛋白沉淀试剂的准备

利用纯水将 Sulfosalicylic Acid (SSA) 溶解配制为 5% 的溶液作为蛋白沉淀试剂, 另外利用 Glutathione Assay Buffer 将 5% SSA 稀释为 0.5% 浓度溶液作为样品和标准品稀释液, 室温保存不超过 24 小时。

2. 样品的准备

- 2.1 细胞裂解上清的准备: 将需要测定的细胞 (1×10^6 - 1×10^7) 收集到 1.5 ml 的离心管中, 4°C、300 g 离心 5 分钟, 弃去上清, 然后加入 200 μ l 含 0.1% Triton X-100 的 Glutathione Assay Buffer, 冰浴裂解 30 分钟, 4°C、10000 g 离心 10 分钟, 收集上清 (如需测定蛋白浓度

用于后续校准, 取此上清液进行蛋白定量)。取部分上清到新的 1.5 ml 离心管中, 加入等体积的 5% SSA, 振荡混匀后冰浴 5 分钟, 4°C、10000 g 离心 5 分钟, 收集上清, 利用 Glutathione Assay Buffer 将上清稀释 5 倍至 SSA 浓度为 0.5%, 待测。

2.2 组织裂解上清的准备: 将需要测定的组织(20-50 mg)收集到玻璃匀浆器或自动匀浆管中, 然后加入 500 μ l 含 0.1% Triton X-100 的 Glutathione Assay Buffer, 匀浆 1 分钟, 将匀浆液转移到 1.5 ml 离心管中, 4°C、10000 g 离心 10 分钟, 收集上清(如需测定蛋白浓度用于后续校准, 取此上清液进行蛋白定量)。取部分组织裂解上清到新的 1.5 ml 离心管中, 加入等体积的 5% SSA, 振荡混匀后冰浴 5 分钟, 4°C、10000 g 离心 5 分钟, 收集上清, 利用 Glutathione Assay Buffer 将上清稀释 5 倍至 SSA 浓度为 0.5%, 待测。

注: 各种样品, 如果不立即进行测定, 请冻存于-80°C; 正式测定前根据预实验结果, 可以进一步利用含 0.5% SSA 的 Glutathione Assay Buffer 将含高浓度谷胱甘肽样品适当稀释后进行测定。

3. 标准品的准备

GSH 标准品的准备: 在 1.5 ml 离心管中, 加入 990 μ l 含 0.5% SSA 的 Glutathione Assay Buffer, 取 10 μ l 的 1 mM 浓度的 GSH Standard 加入离心管中配制 10 μ M 浓度的 GSH Standard; 另外取 5 根 1.5 ml 离心管, 分别加入 200 μ l 含 0.5% SSA 的 Glutathione Assay Buffer, 再吸取 200 μ l 的 10 μ M 浓度 GSH Standard 依次倍倍稀释为 5、2.5、1.25、0.625、0.312 μ M 浓度。

GSSG 标准品的准备: 在 1.5 ml 离心管中, 加入 990 μ l 含 0.5% SSA 的 Glutathione Assay Buffer, 取 10 μ l 的 0.5 mM 浓度的 GSSG Standard 加入离心管中配制 5 μ M 浓度的 GSSG Standard; 另外取 5 根 1.5 ml 离心管, 分别加入 200 μ l 含 0.5% SSA 的 Glutathione Assay Buffer, 再吸取 200 μ l 的 5 μ M 浓度 GSSG Standard 依次倍倍稀释为 2.5、1.25、0.625、0.312、0.156 μ M 浓度。

4. Masking Reagent 的准备

利用 Glutathione Assay Buffer 将 Masking Reagent 稀释 25 倍。

5. 检测工作液的准备

谷胱甘肽检测工作液的配制: 根据待测样品数参考下表比例配制适量的谷胱甘肽检测工作液, 表中试剂按比例混合后即即为谷胱甘肽检测工作液。

注意: 谷胱甘肽检测工作液现用现配, 并立即使用。

	1 个样品	10 个样品	100 个样品
--	-------	--------	---------

Glutathione Assay Buffer	94 μ l	940 μ l	9.4 ml
DTNB Solution	2 μ l	20 μ l	200 μ l
NADPH	2 μ l	20 μ l	200 μ l
Glutathione Reductase	2 μ l	20 μ l	200 μ l

测定方法

1. 总谷胱甘肽的测定：在 96 孔板中设置空白对照孔、标准品孔和样品孔，如下表所示，在空白对照孔中加入 25 μ l 含 0.5% SSA 的 Glutathione Assay Buffer，在标准品孔中加入 25 μ l 梯度浓度 GSH Standard (0.312-10 μ M)，在样品孔中加入 25 μ l 样品；然后各孔加入 25 μ l Glutathione Assay Buffer，37°C 孵育 1 小时；最后各孔加入 50 μ l 谷胱甘肽检测工作液，25°C 孵育 20 分钟，每 5 分钟测定 1 次 412nm 吸光度值。

	空白对照孔	标准品孔	样品孔
0.5% SSA 的 Glutathione Assay Buffer	25 μ l	—	—
GSH Standard	—	25 μ l	—
样品	—	—	25 μ l
Glutathione Assay Buffer	25 μ l	25 μ l	25 μ l
37°C 孵育	1 h	1 h	1 h
谷胱甘肽检测工作液	50 μ l	50 μ l	50 μ l
25°C 孵育	20 min	20 min	20 min

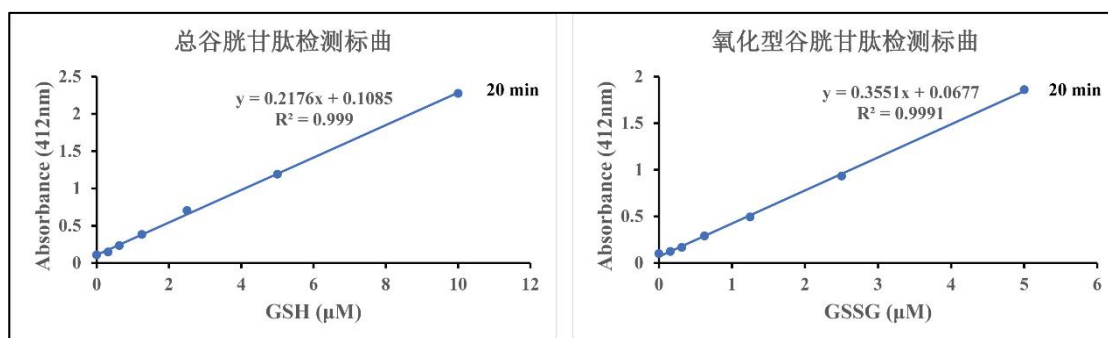
2. 氧化型谷胱甘肽的测定：在 96 孔板中设置空白对照孔、标准品孔和样品孔，如下表所示，在空白对照孔中加入 25 μ l 含 0.5% SSA 的 Glutathione Assay Buffer，在标准品孔中加入 25 μ l 梯度浓度 GSSG Standard (0.156-5 μ M)，在样品孔中加入 25 μ l 样品；然后各孔加入 25 μ l 稀释后的 Masking Reagent，37°C 孵育 1 小时；最后各孔加入 50 μ l 谷胱甘肽检测工作液，25°C 孵育 20 分钟，每 5 分钟测定 1 次 412nm 吸光度值。

	空白对照孔	标准品孔	样品孔
0.5% SSA 的 Glutathione Assay Buffer	25 μ l	—	—
GSSG Standard	—	25 μ l	—
样品	—	—	25 μ l
Masking Reagent	25 μ l	25 μ l	25 μ l
37°C 孵育	1 h	1 h	1 h
谷胱甘肽检测工作液	50 μ l	50 μ l	50 μ l
25°C 孵育	20 min	20 min	20 min

数据处理

利用 GSH Standard 或 GSSG Standard 浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标制作标准曲线，然后利用样品测定中的吸光度值，计算样品的总谷胱甘肽浓度和氧化型谷胱甘肽浓度，还原型谷胱甘肽浓度则为总谷胱甘肽浓度减去 2 倍氧化型谷胱甘肽浓度。T-GSH 和 GSSG 标曲

测定如下图所示:



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)、细胞培养上清中 T-GSH、GSSG 含量:

T-GSH 含量 ($\mu\text{mol/L}$) = $(\Delta A_1 - b_1) \div a_1 \times 10^{**} \times f$

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

动物组织中 T-GSH、GSSG 含量:

T-GSH 含量 ($\mu\text{mol/g}$) = $(\Delta A_1 - b_1) \div a_1 \div (m/V_1) \times 10^{**} \times f$

GSSG 含量 ($\mu\text{mol/g}$) = $(\Delta A_2 - b_2) \div a_2 \div (m/V_1) \times 10^{**} \times f$

T-GSH 含量 ($\mu\text{mol/mg prot}$) = $(\Delta A_1 - b_1) \div a_1 \times 10^{**} \times f \div \text{Cpr}$

GSSG 含量 ($\mu\text{mol/mg prot}$) = $(\Delta A_2 - b_2) \div a_2 \times 10^{**} \times f \div \text{Cpr}$

培养细胞中 T-GSH、GSSG 含量:

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

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

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)

10^{**}: 样本处理过程中, 稀释了 10 倍

f: 样本加入检测体系之前的稀释倍数

m: 组织湿重 g

V_1 : 动物组织处理过程中加入裂解液的体积 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裂解液的体积 L

Cpr: 上清液蛋白质浓度, mg/L

参考文献

1. Alisik M., Alisik T., Nacir B., Neselioglu S., Genc-Isik I., Koyuncu P., et al. Erythrocyte

- reduced/oxidized glutathione and serum thiol/disulfide homeostasis in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Biochem.* 2021; 94: 56-61.
2. Ngamchuea K., Batchelor-McAuley C., Compton R.G. Rapid method for the quantification of reduced and oxidized glutathione in human plasma and saliva. *Anal. Chem.* 2017; 89 (5): 2901-2908.