GSH 和 GSSG 检测试剂盒

货号：RK05819

规格：100 T

◆ 产品简介

GSH 和 GSSG 检测试剂盒（GSH and GSSG Assay Kit）是一种简单易行的可以分别检测出 GSH（还原型谷胱甘肽）和 GSSG（氧化型谷胱甘肽，oxidized glutathione disulfide）含量的检测试剂盒。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，所以常简写为 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，所以常简写为 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 GSSG 还原成 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 A_{412} 就可以计算出总谷胱甘肽的量。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。用总谷胱甘肽（GSSG+GSH）的量扣除 GSSG 的含量，就可以计算出 GSH 的含量。

本试剂盒的具体反应原理如下：

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

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

两个反应相合并：

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

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 GSH 和 GSSG 的含量。

本试剂盒提供了蛋白去除试剂 M，可以更加准确地测定出含有蛋白的样品中的 GSH 和 GSSG 的量。

本试剂盒的检测下限为 0.5 μM。一个试剂盒共可以进行 100 次检测，可以测定 100 个样品的总谷胱甘肽或 GSSG 的含量，或可以测定出 50 个样品中 GSH 和 GSSG 的各自含量。

◆ 试剂盒包装清单

400-999-6126 cn.market@abclonal.com www.abclonal.com.cn

产品编号	产品名称	规格
RK05819-1	总谷胱甘肽检测缓冲液	60 mL
RK05819-2	谷胱甘肽还原酶	150 μL
RK05819-3	氧化型谷胱甘肽(GSSG)	5 mg
RK05819-4	DTNB	4.5 mg
RK05819-5	蛋白去除试剂M	1 g
RK05819-6	NADPH	4 mg
RK05819-7	DMSO	1.5 mL
RK05819-8	GSH清除辅助液	2 mL
RK05819-9	GSH清除试剂	500 μL
——	说明书	1 份

◆ 保存条件

-20℃保存，一年有效。

GSSG 配制成溶液后，需适当分装，-20℃保存至少三个月有效。DTNB 溶解于 DMSO 后，需适当分装，-20℃保存至少三个月有效。蛋白去除试剂 M 配制成溶液后仅限当天使用。NADPH 溶解后，适当分装，-80℃保存。稀释的 GSH 清除辅助液和 GSH 清除试剂溶液均须新鲜配制使用。

◆ 操作说明

1. 试剂盒的准备

(1) GSSG 储备液的配制

在本试剂盒提供的 5 mg GSSG 中加入 816 μL 超纯水，溶解并混匀，即为 GSSG 储备液，浓度为 10 mM。除立即使用部分外，其余 GSSG 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 4.5 mg 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。除立即使用部分外，其余 DTNB 储备液适当分装后-20℃保存。

(3) 蛋白去除试剂 M 溶液的配制

称取 0.2 g 蛋白去除试剂 M，加入 4 mL 总谷胱甘肽检测缓冲液，配制成 4 mL 5%的水溶液。蛋白去除试剂 M 溶液必须新鲜配制并限当天使用。

(4) NADPH 储备液（40 mg/mL）的配制

在本试剂盒提供的 4 mg NADPH 中加入 100 μL 超纯水，溶解并混匀，即为 NADPH 储备液。除立即使用部分外，其余 NADPH 储备液适当分装后-80℃保存。

(5) 5 倍稀释谷胱甘肽还原酶的配制

取 50 μL 谷胱甘肽还原酶，加入 200 μL 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 例混合后即为总谷胱甘肽检测工作液。

	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) 0.5 mg/mL NADPH 的配制

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

(8) 稀释的 GSH 清除辅助液的配制

在 47 μL 超纯水中加入 53 μL GSH 清除辅助液，立即混匀。稀释后的 GSH 清除辅助液不太稳定，每次使用时均须新鲜配制，并仅限当日使用。

(9) GSH 清除试剂工作液的配制

10.8 μL GSH 清除试剂中加入 89.2 μL 无水乙醇，立即混匀。GSH 清除剂工作液每次也须新鲜配制。

2. 标准品的准备

(1) 把 10 mM GSSG 储备液用蛋白去除试剂 M 溶液稀释成 15 μM GSSG 溶液。然后依次稀释成 10、5、2、1、0.5 μM GSSG 溶液。取 15、10、5、2、1、0.5 μM GSSG 溶液六个点做标准曲线。注意：由于 GSSG 在蛋白去除试剂 M 溶液中不太稳定，用蛋白去除试剂 M 溶液配制的 GSSG 溶液必须新鲜配制后使用，不可冻存后再使用。

(2)如果需要测定样品中 GSSG 含量，按照每 100 μL 标准品加入 20 μL 稀释的 GSH 清除辅助液的比例加入稀释的 GSH 清除辅助液，立即 vortex 混匀。然后按照每 100 μL 加入 4 μL GSH 清除试剂工作液的比例加入 GSH 清除试剂工作液，立即 vortex 混匀，25℃反应 60 min。即可用于后续的 GSSG 含量的检测。

3. 待测总谷胱甘肽含量样品和标准品的准备

(1) 组织样品的准备

取组织用液氮速冻，然后研成粉末。每 10 mg 研碎的组织粉末，加入 30 μL 蛋白去除试剂 M 溶液，充分 Vortex。再加入 70 μL 蛋白去除试剂 M 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 M 溶液进行匀浆）。4℃放置 10 min 后，10000 g，4℃离心 10 min，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-80℃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 M 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 M 溶液，即如果细胞沉淀为 10 μL，则加入 30 μL 蛋白去除试剂 M 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。10 mg 细胞沉淀的体积可以粗略地看做 10 μL。）。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 min。4℃，10000 g 离心 10 min。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-80℃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 M 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。600 g 离心 10 min，沉淀为红细胞，上清为血浆。对于红细胞，用 PBS 洗涤两次。取约 50 μL 红细胞沉淀或血浆，加入 50 μL 蛋白去除试剂 M 溶液，充分 Vortex。4℃或冰浴放置 10 min。4℃，10000 g 离心 10 min。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-80℃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 M 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 10 μL 进行测定。

注：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. 待测 GSSG 含量样品的准备

取部分上述准备好的待测总谷胱甘肽含量的样品，按照每 100 μL 样品加入 20 μL 稀释的 GSH 清除辅助液的比例加入稀释的 GSH 清除辅助液，立即 vortex 混匀。再按照每 100 μL 样品加入 4 μL GSH 清除试剂工作液的比例加入 GSH 清除工作液，立即 vortex 混匀，25℃反应 60 min。通过上述反应可以清除高达 50 μM 的 GSH，如果样品中 GSH 含量过高需进行适当稀释后再进行去除 GSH 的操作。通过上述处理就可以用于后续的测定。

5. 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 150 μL 总谷胱甘肽检测工作液后，混匀，25℃室温孵育 5 min。

	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M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
0.5 mg/mL NADPH	50 μL	50 μL	50 μL

(2) 加入 50 μL 0.5mg/mL NADPH 溶液，混匀。

(3) 立即用酶标仪测定 A_{412}，每 5 min 测定一次或实时测定，共测定 25 min，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 min，仅测定一次 A_{412}）。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 A_{412}，可以测定 405-414 nm 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 min，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。**注意：如果进行 GSSG 含量测定，标准品也须平行地进行去除 GSH 的相关操作，以减小误差。如果样品需同时测定总谷胱甘肽含量和 GSSG 含量，由于两者的检测体系不同，须分别单独做标准曲线。**

(4) 标准品的实测效果参考图

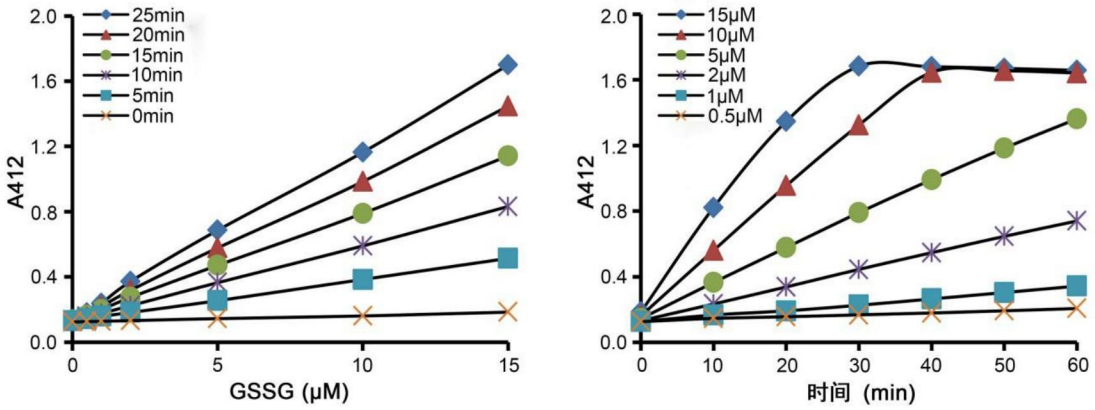

图 1. GSSG 标准曲线实测效果图。图中数据仅供参考，实际的检测效果可能会因具体反 应条件的不同而有所不同。

6. 样品中总谷胱甘肽含量的计算

(1) 单点测定法

即反应 25 min（或 30-60 min）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（标准曲线计算得到的 GSSG 浓度乘以 2）或 GSSG 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。**注意：由于 1 个 GSSG 分子反应后可以还原成 2 个 GSH 分子，所以 GSSG 的浓度如果换算成 GSH 的浓度时需乘以 2，例如完全清除样品中内源 GSH 的情况下，GSSG 的浓度为 5 μM，则相当于 GSH 的浓度为 10 μM。**

(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ΔA_{412}/min。然后以标准品的浓度为横坐标， 以ΔA_{412}/min 为纵坐标，做出标准曲线。根据样品的ΔA_{412}/min，对照标准曲线就可以计算出测定时样品中总谷胱甘肽或 GSSG 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 mg 组织或细胞中的总谷胱甘肽或 GSSG 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 mg 蛋白中总谷胱甘肽或 GSSG 的含量。

(4) 根据测定得到的总谷胱甘肽的含量和 GSSG 的含量就可以计算出 GSH 的含量。

计算公式为：GSH=Total Glutathione-GSSG×2（注意：Total Glutathione 为通过标准曲线计算得到的 GSSG 浓度乘以 2，同时清除 GSH 后得到的 GSSG 也要乘以 2，因为 1 个 GSSG 分子在反应后可以还原成 2 个 GSH 分子）。例如通过本试剂盒测定的总谷胱甘肽（Total Glutathione）的浓度是 15 μM（即在测定总谷胱甘肽时通过标准曲线计算得到的 GSSG 浓度为 7.5 μM，乘以 2 即为总谷胱甘肽浓度），测定的 GSSG 的浓度是 1.2 μM（即在单独测定 GSSG 含量时通过标准曲线计算得到的 GSSG 浓度为 1.2 μM），那么样品中 GSH 的浓度为 15-1.2×2=12.6 μM。

◆ **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，否则每次都需做标准曲线。
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. 蛋白去除试剂 M 溶液必须新鲜配制并限当日使用。GSH 清除试剂也须新鲜稀释后使用。
5. 蛋白去除试剂 M 较难溶解，可以通过剧烈 vortex 并适当加热（不超过 37℃）以促进溶解。
6. 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。
7. 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。
8. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。