氧化型谷胱甘肽(GSSG)检测试剂盒(DTNB 微板法)

产品简介:

谷胱甘肽(glutathione，GSH)存在于几乎身体的每一个细胞，参与细胞许多功能活动，是一种氧自由基消除剂。谷胱甘肽能帮助保持正常的免疫系统功能，保护组织细胞免受氧化损伤，并具有抗氧化作用和整合解毒作用,半胱氨酸上的巯基为其活性基团,故常简写为G-SH或GSH。GSH 易与某些药物(如扑热息痛)、毒素(如自由基、碘乙酸、铅、汞、砷等)等结合，具有整合解毒作用，在延缓衰老、增强免疫力、抗肿瘤等功能性食品中广泛应用。谷胱甘肽是研究活性氧和自由基的重要指标，亦是机体氧化物牵累的重要指标。还原型谷胱甘肽(GSH)是一种含γ-酰胺键和巯基的三肽，由谷氨酸、半胱氨酸及甘氨酸组成，能可逆的转变为氧化型谷胱甘肽(GSSG)，其存在形式会随着细胞内代谢的情况而发生相互转变。

氧化型谷胱甘肽(GSSG)检测试剂盒(DTNB 微版法)(GSSG Assay Kit)是一种简单易行的GSSG 检测的试剂盒,其检测原理是谷胱甘肽还原酶(GR)把 GSSG 还原成 GSH,由 GSSG还原成的 GSH 和样品本身含有的 GSH 都与发色底物 DTNB 反应，生成黄色的 TNB 和 GSSG，总谷胱甘肽(T-GSH，GSSG+GSH)就相当于一个呈色的限速反应， T-GSH 含量决定了黄色含量，用适当的方法先清除样品中的 GSH，然后利用 GR 将 GSSG 还原为 GSH，通过分光光度法(酶标仪)检测 412nm 处吸光度，带入回归方程就可以计算出 GSSG 的量。该试剂盒可用于测定血浆、血清、植物或动物组织、细胞等样品中氧化型谷胱甘肽(GSSG)含量，亦可检测总谷胱甘肽(T-GSH)含量。该试剂盒仅用于科研，不用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

编号 / 名称	GCTO1042 100T	Storage
试剂(A): 蛋白清除试剂	50ml	RT
试剂(B): GSSG 标准	12.5mg	4℃ 避光
试剂(C): GSH 清除辅助液	2.5ml	RT 避光
试剂(D): GSH 清除剂	0.5ml	-20℃ 避光
试剂(E): GSSG assay buffer	100ml	RT
试剂(F): NADPH	16.6mg	-20℃ 避光
试剂(G):DTNB	39.6mg	4℃
试剂(H): DMSO	8ml	RT
试剂(I): GR	45μl	4℃ 避光
使用说明书	1 份	

自备材料：

1、蒸馏水、PBS 或生理盐水、70%乙醇

2、匀浆器或研钵、离心管或小试管、低温离心机、水浴锅、96 孔板、酶标仪

操作步骤(仅供参考)**：**

1、配制 GSSG 标准储存液：取 12.5mg GSSG 标准加入 2ml ddH_2O，溶解并混匀，即为 GSSG 标准储存液(10mM)。一部分立即使用，其余适当分装后-20℃保存。

2、配制 GSH 清除剂工作液：在 0.5ml GSH 清除剂中加入 4.5ml 70%乙醇，溶解并混匀，即为 GSH 清除剂工作液。

3、配制 NADPH 工作液：在 16.6mg NADPH 中加入 2ml ddH_2O，即成 NADPH 工作液，一部分立即使用，其余适当分装后-20℃保存。

4、配制 DTNB 储存液：在 39.6mg DTNB 中加入 8ml DMSO，溶解并混匀，即为 DTNB 储存液(12.5mM)。一部分立即使用，其余适当分装后-20℃保存。

5、配制 GR 工作液：按 GR：GSSG assay buffer =1:49 的比例混合，即为 GR 工作液。-20℃保存，1 个月有效。注意：试剂(I)量较少，使用前应先 4℃离心后再使用。

6、配制标准品：把 GSSG 标准储存液(10mM)用蛋白清除试剂稀释成 50μM 标准溶液，然后依次稀释成 25、12.5、6.25、3.125μM GSSH 标准溶液，取空白、3.125、6.25、12.5、25、50μM GSSG 标准溶液 6 个点作标准曲线。注意：由于 GSSG 标准在蛋白清除试剂中不太稳定，用蛋白清除试剂配制的 GSSG 溶液必须新鲜配制后使用，不可冻存后再使用。。

7、准备样品：

①红细胞或血浆样品：取新鲜血液，600 r/min 离心 10min，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 蛋白清除试剂，充分 Vortex 振匀。4℃或冰浴放置 10min，4℃ 10000 r/min 离心 10min，取上清，用于 GSSG 测定，样品需暂时 4℃保存备用，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清除试剂稀释 10 倍后再进行后续的测定，而对于血浆样品，应直接进行测定。

②植物或动物组织样品：取组织用液氮速冻，迅速研磨，按每 40mg 加入 100μl 蛋白清除试剂(亦可不用液氮，可直接加蛋白清除试剂至组织后匀浆或研磨)。充分 Vortex 振匀，再加入 300μl 蛋白清除试剂，用匀浆器充分匀浆。4℃孵育 10min，4℃ 10000 r/min 离心 10min，取上清，用于 GSSG 测定。样品需暂时 4℃保存备用，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清除试剂进行适当稀释后再进行测定，稀释倍数通常为 5～20 倍。

③细胞样品：PBS 洗涤细胞 1 次，离心收集细胞，吸尽上清，加入细胞沉淀 3 倍体积的蛋白清除试剂，充分 Vortex 振匀(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 10ml。)对样品进行快速的冻融后，4℃或冰上孵育 5min，4℃ 10000 r/min 离心 10min，取上清，用于 GSSG 测定。样品需暂时 4℃保存备用，不立即测定的样品可以-70℃保存，但不宜超过 10 天。

8、GSH 加样：取 96 孔板，按照下表设置空白孔、标准孔、测定孔，溶液应按照顺序依次加入，并注意避免产生气泡。如果样品中的 GSSG 浓度过高，可减少用量或适当稀释后再进行测定。

加入物(μl)	空白孔	标准孔	测定孔
蛋白清除试剂	100	50	50
系列标准品(3.125～50μM)	—	50	—
待测样品	—	—	50
GSH 清除辅助液	25	25	25
GSH 清除剂工作液	50	50	50
37℃孵育 30min。			
GSH assay buffer	705	705	705
NADPH 工作液	20	20	20
DTNB 储存液	80	80	80
37℃孵育 10min。			
GR 工作液	20	20	20

9、GSSG 测定：混合均匀后，室温放置 3min，用酶标仪或自动生化分析仪测定 412nm 处吸光值（OD_{412}），各孔或 EP 管吸光度减去未加 GSSG 标准品溶液（即空白孔）的吸光度，以求得的差值为纵坐标：以标准孔或 EP 管中 GSSG 浓度(μM)为横坐标，得出标准曲线及回归方程，根据标准曲线计算出待测样品的 GSSG 浓度。

【注：将 GSH 清除剂换成蒸馏水，测得结果为样品中的总谷胱甘肽（T-GSH）含量。】

参考区间:

健康成年人全血 GSSG	1.02±0.17mmol/L

注意事项：

1、 试剂(I)量较少，使用前应先 4℃离心后再使用。

2、 GSSG 比较稳定，血液样品以 ACD 抗凝后冰箱 4℃保存，3～4 周内稳定。

3、 请尽量使用新鲜的细胞或血液进行测定，不建议用冻存的细胞或血液进行测定，避免使 GSSG 活性下降。

4、 全血 GSSG 与吸烟和锻炼成正比。

5、 测定时，各孔温度均需达到室温或 25℃，否则影响结果。

6、 轻度溶血样本对 GSSG 测定无影响。

7、 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

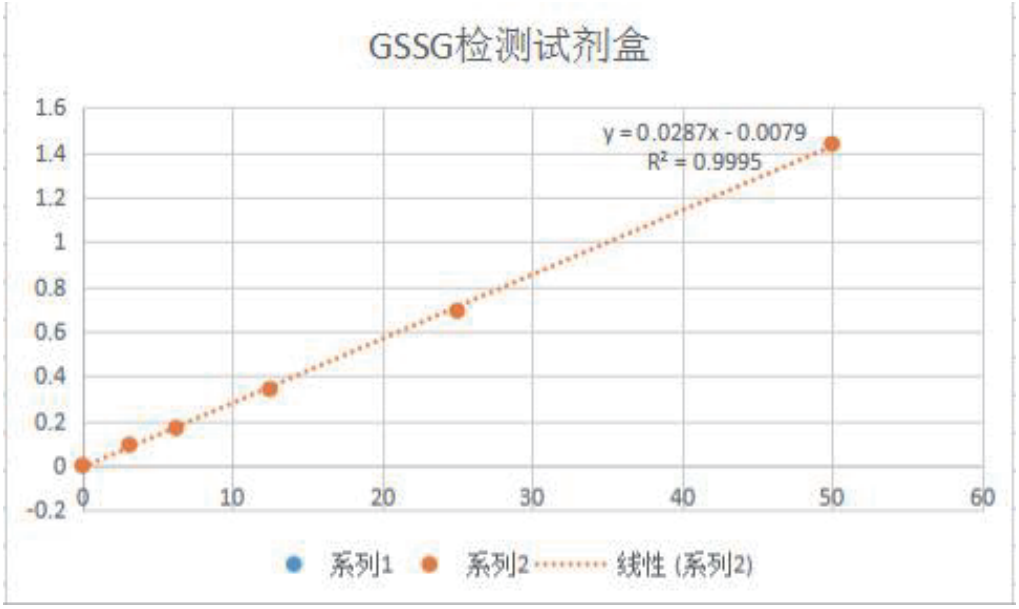
8、 试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

有效期：6 个月有效。低温运输，按要求保存。

相关产品：

产品编号	产品名称
GCDC0032	Masson 三色染色液
GCDM0007	瑞氏-姬姆萨复合染色液
GCNR0001	DEPC 处理水(0.1%)
GCPW0053	Western 抗体洗脱液(碱性)
GCTC0711	葡萄糖检测试剂盒(GOD-POD 微板法)
GCTE0721	总超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(NBT 核黄素比色法)
GCTO1037	还原型谷胱甘肽(GSH)检测试剂盒(DTNB 比色法)

附录：标准曲线制作：在室温条件下按说明书操作，用分光光度计 405nm 对系列标准(0、3.125、6.25、12.5、25、50μM)进行吸光度的测定，其标准曲线如下(仅供参考)：



注意：由于检测仪器和操作手法等条件的不同，标准曲线会有差异，该值仅供参考。