总谷胱甘肽(T-GSH)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，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，半胱氨酸上的巯基为其活性基团，故常简写为 G-SH 或 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，谷胱甘肽具有抗氧化和整合解毒作用，在延缓衰老、增强免疫力、抗肿瘤等功能性食品中有广泛应用。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。

总谷胱甘肽(T-GSH)检测试剂盒(DTNB 微板法)(Total Glutathione Assay Kit)是一种简单易行的检测总谷胱甘肽(T-GSH)的试剂盒，其检测原理是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)，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，前后两个反应合并起来，总谷胱甘肽(GSSG+GSH)就相当于一个呈色的限速反应，总谷胱甘肽(T-GSH)含量决定了黄色含量，通过酶标仪测定 410nm 处的吸光度，与相应处理的 GSH 标准比较，获得样品的总谷胱甘肽(T-GSH)即(GSSG+GSH)含量，可用于测定血浆、血清、植物或动物组织、细胞等样品中总谷胱甘肽(T-GSH)含量。该试剂盒仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

编号 / 名称	GCTO1048 100T	Storage
试剂(A): 还原型谷胱甘肽(GSH)标准	10mg	4℃ 避光
试剂(B): GSH Assay Buffer	100ml	RT
试剂(C): DTNB	10mg	4℃
试剂(D): 蛋白沉淀剂	2.5g	RT
试剂(E): NADPH	10mg	-20℃ 避光
试剂(F): DMSO	1.5ml	RT
试剂(G): ddH_2O	100ml	RT
试剂(H): GSH 还原酶原液	15μl	-20℃ 避光
使用说明书	1 份	

自备材料：

1、蒸馏水、PBS 或生理盐水

2、离心管、96 孔板、小试管、匀浆器、研钵、低温离心机、水浴锅、酶标仪

操作步骤(仅供参考)**：**

1、配制 GSH 标准储存液：取 10mg 还原型谷胱甘肽(GSH)标准加入 3.25ml ddH_2O，溶解并混匀，即为还原型 GSH 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 DTNB 储存液：在本试剂盒提供的 10mg DTNB 中加入 1ml DMSO，溶解并混匀，即为 DTNB 储存液(10mg/ml)；一部分立即使用，其余适当分装后-20℃保存。

3、配制 1×GSH 还原酶：按 GSH 还原酶原液：GSH Assay Buffer =1:49 的比例混合，即为 1×GSH 还原酶；-20℃保存，3 个月有效。

4、配制 T-GSH 检测工作液：按下表配制 T-GSH 检测工作液。

加入物	1 个样品	10 个样品	50 个样品
GSH Assay Buffer	0.2ml	2ml	10ml
DTNB 储存液	2.5μl	25μl	125μl
1×GSH 还原酶	5.4μl	54μl	270μl

5、配制蛋白沉淀工作液：在本试剂盒提供的 2.5g 蛋白沉淀剂中加入 50ml ddH_2O，配制成 50ml 5%的水溶液，即为蛋白沉淀工作液，4℃保存。

6、配制标准品：把还原型 GSH 标准储存液(10mM)用蛋白沉淀工作液稀释成 50μM 标准溶液，然后依次稀释成 25、15、10、5、2μM GSH 溶液，取 50、25、15、10、5、2 μM GSH 标准溶液 6 个点做标准曲线。注意：由于 GSH 标准在蛋白沉淀工作液中不太稳定，用蛋白沉淀工作液配制的 GSH 溶液必须新鲜配制后使用，不可冻存后再使用。

7、配制 NADPH 工作液：在本试剂盒提供的 10mg NADPH 中加入 1ml ddH_2O，溶解并混匀，即为 NADPH 储存液(10mg/ml)；一部分立即使用，其余适当分装后-20℃保存。按 0.1ml NADPH 储存液(10mg/ml)加入 8.23ml 的比例加入 GSH assay buffer，充分混匀，即为 NADPH 工作液(0.12mg/ml)。

8、准备样品：

①红细胞或血浆样品：取新鲜血液，600g 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 蛋白沉淀工作液，充分 Vortex 振匀，4℃或冰浴放置 10min，4℃ 10000g 离心 10min，取上清，用于 T-GSH 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沉淀工作液稀释 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。

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 蛋白沉淀工作液(亦可不用液氮，而是直接加入蛋白沉淀工作液至组织后匀浆或研磨)，充分 Vortex 振匀，再加入 300μl 蛋白沉淀工作液，用匀浆器充分匀浆，4℃孵育 10min，4℃ 10000g 离心 10min，取上清，用于 T-GSH 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沉淀工作液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 倍体积的蛋白沉淀工作液，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℃ 10000g 离心 10min，取上清，用于 T-GSH 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沉淀工作液进行适当稀释后再进行测定，稀释倍数通常为 5～20 倍。

9、 T-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 T-GSH 浓度过高，可以减少样品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
蛋白沉淀工作液	10	—	—
系列标准品(2～50μM)	—	10	—
待测样品	—	—	10
T-GSH 检测工作液	200	200	200
室温或 25℃孵育 5min。			
NADPH 工作液(0.12mg/ml)	50	50	50

10、 T-GSH 检测：立即用酶标仪或自动生化分析仪测定 410nm 处吸光度，每隔 2min 检测一次，空白孔调零，共检测 6min(亦可加入 NADPH 工作液反应 6min 后检测，只检测 1 次)，以检测其反应速率ΔA/min；如果酶标仪不能检测 410nm，可测定 405～420nm 处吸光度。

计算：

①动力学测定法：根据不同时间点测定得到的吸光度计算出ΔA_{410}/min，以 GSH 标准的浓度(50、25、15、10、5、2μM)为横坐标，以ΔA_{410}/min 为纵坐标，作出标准曲线，求出回归方程。根据待测的ΔA_{410}/min，对照标准曲线的回归方程可以计算出测定时样品中总谷胱甘肽的含量，动力学法测定结果比终点测定法的结果精确；根据样品的稀释倍数、以及最初样品的使用量，通过测定蛋白浓度，从而计算出样品的蛋白量，最后计算出每 mg

蛋白中总谷胱甘肽的含量。

②终点测定法：即反应 6min 仅测定 1 次吸光度的方法。以 GSH 标准的浓度(50、25、15、10、5、2μM)为横坐标，以ΔA_{410}/min 为纵坐标，作出标准曲线，求出回归方程，对照标准曲线的回归方程可以计算出测定时样品中总谷胱甘肽的含量，终点测定法比动力学法快捷；根据样品的稀释倍数、以及最初样品的使用量，通过测定蛋白浓度，从而计算出样品的蛋白量，最后计算出每 mg 蛋白中总谷胱甘肽的含量。

参考区间:

成年全血 GSH	1.02±0.17mmol/L

注意事项：

1、 GSH 比较稳定，血液样品以 ACD 抗凝后冰箱 4℃保存，3～4 周内稳定。
2、 请尽量使用新鲜的细胞或血液进行测定，而不要使用冻存的细胞或血液进行测定，避免使 GSH 活性下降。
3、 全血 GSH 与吸烟和锻炼成正比。
4、 测定各管时，各孔温度均需达到室温或 25℃，否则影响结果。
5、 轻度溶血样本对 GSH 测定无影响。
6、 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
7、 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
DP0013GC	GUS 染色液(即用型)
GCTC1167	尿素(Urea)检测试剂盒(脲酶波氏比色法)
GCTO1013	丙二醛(MDA)检测试剂盒(TBA 比色法)

