

GSH 和 GSSG 检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1879BKM

保存：-20℃避光保存 12 个月

规格：48T/48S 96T/96S

GSH 检测范围：15.6μM-1000μM 灵敏度：15.6μM

GSSG 检测范围：0.313μM-20μM 灵敏度：0.313μM

适用样本：动植物组织、细胞、血细胞、细菌、血清（浆）或其他液体

产品简介

谷胱甘肽是甘氨酸、谷氨酸和半胱氨酸组成的天然三肽。在红细胞中，还原型谷胱甘肽是维持血红蛋白处于还原状态的关键，保护细胞免受氧化损伤。谷胱甘肽有还原型（GSH）和氧化型（GSSG）两种形态，氧化型谷胱甘肽（GSSG）是谷胱甘肽的氧化形式，又称为二硫代谷胱甘肽，是两分子的谷胱甘肽氧化而成。GSSG 会被谷胱甘肽还原酶还原成 GSH，因此机体中大多数是以还原型形式存在。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。测定细胞内 GSH 和 GSSG 含量以及 GSH/GSSG 比值，能够很好地反映细胞所处的氧化还原状态，也是谷胱甘肽氧化还原循环的主要指标之一。本试剂盒提供了一种简单的检测方法检测各种生物样本中 GSH 和 GSSG 的含量。其原理是 GSH 能和 5,5'-二硫代-双-(2-硝基苯甲酸) (5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoic acid, DTNB) 反应生成 2-硝基-5-巯基苯甲酸，该物质为黄色，在 412nm 波长处具有最大光吸收，来测定样本中 GSH 的含量。通过 2-乙烯吡啶抑制样品中原有的还原型谷胱甘肽，然后利用谷胱甘肽还原酶（Glutathione reductase, GR）将 GSSG 还原为 GSH，借此测定氧化型谷胱甘肽的含量。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液	50mL	100mL	4℃
GSH 反应缓冲液	10mL	20mL	4℃
GSSG 反应缓冲液	10mL	20mL	4℃
试剂一	300 μL	600 μL	-20℃避光保存
试剂二	10μL	20μL	4℃避光保存
试剂三	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	-20℃避光保存
试剂四	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	4℃避光保存
GSH 标准品	粉剂×1 支	粉剂×1 支	4℃避光保存
GSSG 标准品	粉剂×1 支	粉剂×1 支	4℃避光保存

自备耗材

酶标仪或可见光分光光度计（能测 412nm 处的吸光度）及恒温箱
96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头
制冰机、低温离心机、去离子水、匀浆器（如果是组织样本）

产品说明书

试剂准备

注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。

提取液：即用型；4℃保存。

GSH 反应缓冲液：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

GSSG 反应缓冲液：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂一：即用型；使用前，避光平衡到室温；-20℃避光保存。

试剂二稀释液：使用时，按取试剂二 6μL 加水 0.12mL 的比例配制，整个实验过程中，冰上避光放置。现用现配，用多少配多少；4℃避光保存。

试剂三：使用前 96T 加 1.5mL 去离子水，48T 加 0.75mL 去离子水溶解；分装-20℃避光保存。

试剂四：使用时每瓶加入 5mL 去离子水，4℃避光保存。

标准品制备：

稀释提取液：按 1:10 的比例用去离子水稀释提取液，如：取 500μL 提取液加入 4,500μL 去离子水。

GSH 标准品：

50mM GSH 标准品：每管 GSH 标准品含 15.4mg GSH，使用时加 1mL 稀释后的提取液得 50mM GSH 标准品，4℃避光保存。

1000μM GSH 标准品：取 20 μL 50mM GSH 标准品用 980 μL 稀释后的提取液稀释。

使用 1000μM GSH 标准品，按照下表所示，进一步稀释标准品：

	标准品体积 (μL)	稀释后的提取液体积 (μL)	标准品浓度 (μM)
Std. 1	200μL 1000μM	0	1000
Std. 2	100μL of Std. 1 (1000μM)	100	500
Std. 3	100μL of Std. 2 (500μM)	100	250
Std. 4	100μL of Std. 3 (250μM)	100	125
Std. 5	100μL of Std. 4 (125μM)	100	62.5
Std. 6	100μL of Std. 5 (62.5μM)	100	31.25
Std. 7	100μL of Std. 6 (31.25μM)	100	15.6

注意：每次实验，请使用新配制的标准品；配制好的标准品需要在 4h 之内使用。

GSSG 标准品：

20mM GSSG 标准品：取 1 管标准品，用 1mL 稀释后的提取液溶解得 20mM GSSG 标准品；4℃避光保存。

20μM GSSG 标准品：取 1 μL 20mM GSSG 标准品用 999 μL 稀释后的提取液稀释，使用 20μM GSSG 标准品，按照下表所示，进一步稀释标准品：

	标准品体积 (μL)	稀释后的提取液体积 (μL)	标准品浓度 (μM)
Std. 1	200	0	20
Std. 2	100μL of Std. 1	100	10
Std. 3	100μL of Std. 2	100	5
Std. 4	100μL of Std. 3	100	2.5
Std. 5	100μL of Std. 4	100	1.25
Std. 6	100μL of Std. 5	100	0.625
Std. 7	100μL of Std. 6	100	0.313

注意：每次实验都要做一次标准品检测，制作标曲；稀释后的标准品溶液不稳定，必须在 4 小时内使用。

样本制备

产品说明书

动物组织：称取 0.1g 组织样本，加入 1mL 预冷的提取液，快速冰上匀浆。匀浆后的样本，8,000 g，4℃ 离心 10min，取上清液，置冰上待测。

植物组织：称取 0.1g 植物组织剪碎，加入 1mL 预冷的提取液，快速冰上匀浆。匀浆后的样本冰浴超声波破碎 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次）。超声后的样本，8,000g，4℃ 离心 10min，取上清液，置冰上待测。

血清或血浆：按常规方法收集血清，加入等体积的提取液，4℃，8,000g 离心 10min，取上清液，置冰上待测。将收集的抗凝血于 4℃，600g 离心 10min，30min 内吸取上层血浆到另一支试管中，加入等体积的提取液，4℃，8,000g 离心 10min，取上清液，置冰上待测。

血细胞：将收集的抗凝血于 4℃，600g 离心 10min，弃去上层血浆，用 PBS 重悬，收集 5×10^6 个血细胞，用冷 PBS 清洗 2 次（用 PBS 重悬血细胞，4℃ 600g 离心 10min），加入 1mL 预冷的提取液，冰浴超声波破碎 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次）。超声后的样本，8,000g，4℃ 离心 10min，取上清液，置冰上待测。

细胞或细菌：收集 5×10^6 个细胞或细菌，首先用冷 PBS 清洗细胞 2 次（用 PBS 重悬细胞，4℃ 600g 离心 10min），加入 1mL 预冷的提取液重悬细胞或细菌，冰浴超声波破碎 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次）。超声后的样本，8,000g，4℃ 离心 10min，取上清液，置冰上待测。

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在 -80℃ 保存 1 个月。提取过程中去掉蛋白质，所以提取液不能用于测定蛋白含量。

实验步骤

GSH 测定：

1. 酶标仪或可见光分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 412nm，可见光分光光度计去离子水调零。
2. 在 96 孔板或微量玻璃比色皿中按照如下方式加样：

试剂 (μL)	空白孔	标准孔	测定孔
样本	0	0	20
稀释后的提取液	20	0	0
标准品	0	20	0
GSH 反应缓冲液	140	140	140
试剂四	40	40	40

充分混匀，37℃ 避光孵育 10min，记录 10min 时的吸光度 $A_{空}$ 、 $A_{标}$ 、 $A_{测}$ 。计算 $\Delta A_{测} = A_{测} - A_{空}$ ， $\Delta A_{标} = A_{标} - A_{空}$ （空白和标准曲线只需测定一次）。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果 $\Delta A_{测}$ 小于 0.005 可适当加大样本量。如果 $\Delta A_{测}$ 大于 2.0，样本可用去离子水进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数。

GSSG 测定：

1. 酶标仪或可见光分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 412nm，可见光分光光度计去离子水调零。
2. 试剂二稀释液、试剂三和试剂四 37℃ 保温 10min。
3. 在 EP 管中按照如下方式加样：

试剂 (μL)	空白	标准	测定
去离子水	0	0	90
稀释后的提取液	100	0	0
标准品	0	100	0
样本	0	0	10
试剂一	5	5	5

混匀，37℃ 孵育 30min，取 21μL 混合液于微量玻璃比色皿或 96 孔板中

产品说明书

混合液	21	21	21
GSSG 反应缓冲液	140	140	140
试剂二稀释液	2	2	2
试剂三	20	20	20
试剂四	40	40	40

4. 充分混匀, 37°C 避光孵育 10min, 记录 10min 时的吸光度 $A_{空}$ 、 $A_{标}$ 、 $A_{测}$ 。计算 $\Delta A_{测}=A_{测}-A_{空}$, $\Delta A_{标}=A_{标}-A_{空}$ (空白和标准曲线只需测定一次)。

注意: 1. 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果 $\Delta A_{测}$ 小于 0.005 可适当加大样本量。如果 $\Delta A_{测}$ 大于 2.0, 样本可用去离子水进一步稀释, 计算结果乘以最终稀释倍数。

2. 如果样本量过多, 可将 GSSG 反应缓冲液、试剂二稀释液、试剂三与试剂四按照比例混匀配成工作再加入。
结果计算

GSH 含量:

1. 标准曲线的绘制

以标准品浓度为 y 轴, $\Delta A_{标}$ 为 x 轴, 绘制标准曲线 (浓度为 y 轴更方便计算结果)。

2. GSH 含量的计算

将样本的 $\Delta A_{测}$ 代入方程得到 y 值 ($1\mu\text{M}=1\text{nmol/mL}$)。

(1) 按样本鲜重计算

$$\text{GSH (nmol/g 鲜重)} = y \times V_{样} \div (W \times V_{样} \div V_{样总}) \times n = y \div W \times n$$

(2) 按液体样本体积计算

$$\text{GSH (nmol/mL)} = 2 \times y \times V_{样} \div V_{样} \times n = 2y \times n$$

(3) 按细胞数目计算

$$\text{GSH (nmol/10}^4 \text{ cells)} = y \times V_{样} \div (500 \times V_{样} \div V_{样总}) \times n = y \div 500 \times n = 0.002 \times y \times n$$

$V_{样}$: 加入样本体积, 0.02mL; W : 样本质量, 0.1g; $V_{样总}$: 加入提取液体积, 1mL; n : 样本进一步稀释的稀释倍数; 2: 液体样本制备时的稀释倍数, 加入等体积的提取液即稀释 2 倍; 500: 细胞数量, 500 万。

GSSG 含量:

1. 标准曲线的绘制

以标准品浓度为 y 轴, $\Delta A_{标}$ 为 x 轴, 绘制标准曲线 (浓度为 y 轴更方便计算结果)。

2. GSSG 含量计算

将 $\Delta A_{测}$ 代入方程得到 y 值 ($1\mu\text{M}=1\text{nmol/mL}$)。

(1) 按样本鲜重计算

$$\text{GSSG (nmol/g 鲜重)} = y \times V_{样} \div (W \times V_{样} \div V_{样总}) \times 10 \times n = 10y \div W \times n$$

(2) 按液体样本体积计算

$$\text{GSSG (nmol/mL)} = 2 \times y \times V_{样} \div V_{样} \times 10 \times n = 20y \times n$$

(3) 按细胞数目计算

$$\text{GSSG (nmol/10}^4 \text{ cells)} = y \times V_{样} \div (500 \times V_{样} \div V_{样总}) \times 10 \times n = 0.02y \times n$$

$V_{样}$: 反应中加入样本体积, 0.002mL, 根据比例折算 $10\mu\text{L} \times (21 \div 105) = 2\mu\text{L}$; W : 样本质量, g; $V_{样总}$: 加入提取液体积, 1mL; 10: 样本检测时的稀释倍数, $(10+90) \div 10$; 2: 液体样本制备时的稀释倍数, 加入等体积的提取液即稀释 2 倍; n : 样本进一步稀释的稀释倍数; 500: 细胞数量, 500 万。

总谷胱甘肽含量:

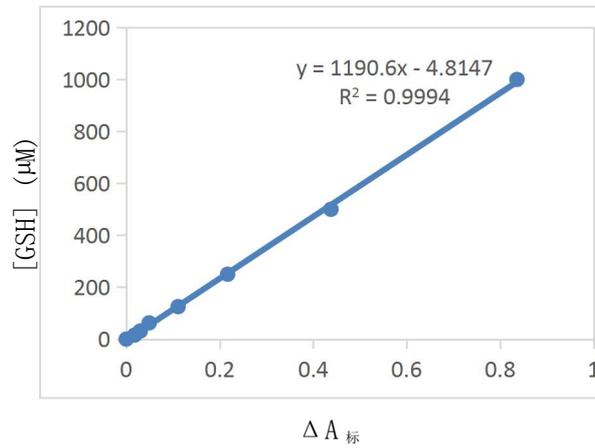
$$\text{总谷胱甘肽} = \text{GSH} + 2 \times \text{GSSG}$$

2: 1 个 GSSG 分子在反应后可以还原成 2 个 GSH 分子。

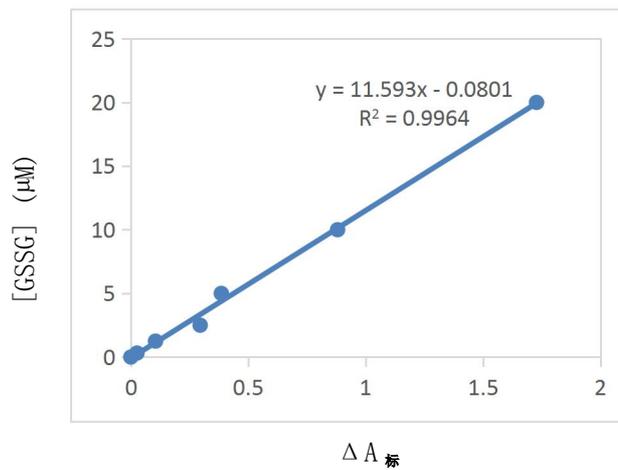
结果展示

典型标准曲线

GSH 标准曲线



GSSG 标准曲线



注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

- PMK1023BKM 还原型谷胱甘肽（GSH）检测试剂盒（微量法）
- PMK1024BKM 氧化型谷胱甘肽（GSSG）检测试剂盒（微量法）
- PMK1022BKM 谷胱甘肽还原酶（GR）检测试剂盒（微量法）
- PMK1025BKM 谷胱甘肽过氧化物酶（GPX）检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

