

氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 检测试剂盒 (DTNB速率微板法)

产品货号: BA1743

产品规格: 100T

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,故常简称为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,能可逆的转变成为氧化型谷胱甘肽(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速率微板法)(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:

试剂名称	规格	保存条件
试剂(A): 蛋白清除试剂	50ml	室温
试剂(B): GSSG 标准	12.5mg	2-8℃ 避光
试剂(C): GSH 清除辅助液	2.5ml	室温 避光
试剂(D): GSH 清除剂	0.5ml	-20℃ 避光
试剂(E): GSSG assay buffer	100ml	室温
试剂(F): NADPH	16.6mg	-20℃ 避光
试剂(G): DTNB	39.6mg	室温 避光
试剂(H): DMSO	8ml	室温 避光
试剂(I): GR	45 μ l	2-8℃ 避光

需自备的仪器和用品:

匀浆器或研钵、离心管或小试管、低温离心机、水浴锅、蒸馏水、PBS或生理盐水、70%乙醇、96孔板、酶标仪。

操作步骤:

1. 配制GSSG标准储存液: 取12.5mg GSSG标准加入2ml ddH₂O, 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 ddH₂O, 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, 建议4℃离心后使用。
6. 配制标准品: 把GSSG标准储存液(10mM)用蛋白清除剂稀释成50 μ M标准溶液, 然后依次稀释成25、12.5、6.25、3.125 μ M GSSH标准溶液, 取空白、3.125、6.25、12.5、25、50 μ M GSSG标准溶液6个点作标准曲线。注意: 由于GSSG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50 μ l红细胞沉淀或血浆, 加入50 μ l蛋白沉淀工作液, 充分Vortex振匀。4℃或冰浴放置10min, 4℃ 10000r/min



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzybio@126.com

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, 可直接加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℃ 10000r/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℃ 10000r/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(OD₄₁₂), 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, 建议4℃离心后使用。
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。

有效期: 6个月有效。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com