

氧化型/还原型谷胱甘肽定量试剂盒

产品货号: BA3490

产品规格: 100T

产品简介:

谷胱甘肽(γ -L-谷氨酰-L-半胱氨酰-甘氨酸)是体内的一种三肽化合物,它参与抗氧化和药物代谢的过程,还是谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽S-转移酶、巯基转移酶等的底物。谷胱甘肽通常以还原型状态(GSH)存在,但是GSH在氧化应激的作用下会转化为氧化型状态(GSSG)。因此GSH/GSSG的比值被认为是氧化应激研究的一个重要指标。

本试剂盒中含有GSH掩蔽剂,加入掩蔽剂可以除去样品溶液中的GSH。因此可以通过检测加入DTNB(5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid))后在412nm处的显色反应加上在谷胱甘肽还原酶作用下的循环体系选择性地对GSSG进行定量。GSH含量则可以通过总谷胱甘肽含量减去GSSG含量来得到。本试剂盒总谷胱甘肽和GSSG的检测限分别为 $0.5\mu\text{mol/l}$ - $50\mu\text{mol/l}$ 和 $0.5\mu\text{mol/l}$ - $25\mu\text{mol/l}$ 。

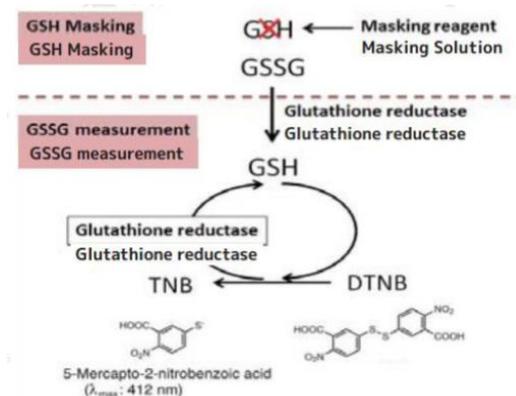


图 1. GSSG/GSH 检测原理

产品组成:

组分名称	100T
Enzyme Solution	50 μl ×1管
Coenzyme	×1管
Buffer Solution	60ml×1管
Substrate (DTNB)	×2管
Standard GSH	×1管
Standard GSSG	×1管
Masking Solution	1ml×1管

所需的设备和材料:

酶标仪(405或415nm)、20 μl 和200 μl 移液器,多通道移液器、96孔板、培养箱、15ml锥形管、5-磺基水杨酸(SSA)溶液、乙醇。

样品制备:

1. 组织(100mg)

- 1) 在 0.5-1.0ml 5% 的 SSA 溶液中对组织匀浆。
- 2) 匀浆后的组织样品在 8,000 \times g, 离心 10min。
- 3) 转移上清液至一支新管中,用 ddH₂O 稀释,将 SSA 浓度调节为 0.5%。^{a)}



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

2. 细胞(1×10^7 个细胞)

- 1) 在 4°C , $200 \times g$ 离心 10min 后收集细胞, 弃上清。
- 2) 用 $300 \mu\text{l}$ PBS 清洗细胞, 在 4°C , $200 \times g$ 离心 10min, 弃上清。
- 3) 加入 $80 \mu\text{l}$ 10 mM HCl, 反复冻融 2 次使细胞裂解。
- 4) 加入 $20 \mu\text{l}$ 5% 的 SSA, 在 $8,000 \times g$ 离心 10min。
- 5) 转移上清液至一支新管中, 用 ddH₂O 稀释, 将 SSA 浓度调节为 0.5%。^{a)}

3. 血浆

- 1) 在 4°C , $1,000 \times g$ 离心抗凝处理的血液 10min。
- 2) 将最上层血浆转移至一支新管中, 加入血浆量的 1/2 体积的 5% 的 SSA。
- 3) 在 4°C , $8,000 \times g$ 离心 10min。
- 4) 转移上清液至一支新管中, 用 ddH₂O 稀释, 将 SSA 浓度调节为 0.5%。^{a)}

4. 红血球^{b)}

- 1) 在 4°C , $1,000 \times g$ 离心抗凝处理的血液 10min。
- 2) 弃上清液及白膜层。
- 3) 用 4 倍体积的 5% SSA 溶解红血球。
- 4) 在 4°C , $8,000 \times g$ 离心 10min。
- 5) 转移上清液至一支新管中, 用 ddH₂O 稀释, 将 SSA 浓度调节为 0.5%。^{a)}

a) 在使用样品溶液前, 请先用 ddH₂O 稀释, 将 SSA 浓度调节为 0.5%, 高浓度的 SSA 会引起溶液 pH 值的变化, 对检测有所干扰。

b) 血球能从血浆分离后所剩样品溶液中分离。

反应溶液的制备:

1. Substrate Working Solution

- 1) 加 1.2ml Buffer Solution 至 Substrate (DTNB)管中, 溶解 DTNB。
 - * 请确认是否完全溶解 DTNB。如溶解不完全时, 请用超声或涡旋振荡。
 - * 如需保存, 则不要继续步骤 2)。直接放在 -20°C 保存, 可以保存 2 个月。
- 2) 转移上述全部溶液至 15ml 锥形管中, 并用 2.4ml Buffer Solution 稀释(总体积为 3.6ml)。
 - * 一个 96 孔板需要使用 2 管 Substrate (总体积: 7.2ml)。
 - * 由于 Substrate Working Solution 不稳定, 所以需要现配现用。

2. Enzyme/Coenzyme Working Solution

- 1) 用移液器吹打混匀 Enzyme Solution, 吸取 $20 \mu\text{l}$ 至 15ml 锥形管中, 用 4ml Buffer Solution 稀释。
 - * Enzyme Solution 可能会附着在管的内壁和盖子上, 开瓶前可轻摇晃下, 但是不可使用旋涡震荡器。
 - * 如需保存, 则不要继续步骤 2)。直接放在 $0-5^{\circ}\text{C}$ 保存, 可以保存 2 个月。
- 2) 取 2.4ml 上述溶液至一支新的 15ml 锥形管中。
- 3) 加 2.4ml ddH₂O 至 Coenzyme 管中并溶解。
 - * 由于 Coenzyme 管做过减压处理, 请用注射器加入 ddH₂O 后再打开。
 - * 如需保存, 则不要继续步骤 4), 将上述溶液放在 -20°C 保存, 可以保存 2 个月。
- 4) 转移上述全部溶液至步骤 2)的 15ml 锥形管中, 并用 2.4ml Buffer Solution 稀释(总体积: 7.2ml)。
 - * 由于 Enzyme/Coenzyme Working Solution 不稳定, 需要现配现用。

3. 200 $\mu\text{mol/l}$ GSH Standard Solution

加 2.0ml 0.5% 的 SSA 至 Standard GSH 管中并溶解。

* 由于 Standard GSH 管做过减压处理, 请用注射器加入 SSA 后再打开。

* 将 GSH Standard Solution 溶液放在 -20°C 保存, 可以保存 2 个月。

4. 100 $\mu\text{mol/l}$ GSSG Standard Solution



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

加 2.0ml 0.5%的 SSA 至 Standard GSSG 管中并溶解。

* 由于 Standard GSSH 管做过减压处理，请用注射器加入 SSA 后再打开。

* 将 GSSG Standard Solution 溶液放在-20°C 保存，可以保存 2 个月。

操作步骤：(仅供参考)

1. 样品制备

1) 如需要测定 GSH 和 GSSG，请准备 2 组样品溶液(200 μ l \times 2)。

● 测定 GSSG：加 200 μ l 的样品，20 μ l 的 Masking Solution 至一个微管中，用涡旋振荡器混匀，作为(GSSG)样品管。

● 测量总谷胱甘肽：取 200 μ l 样品加入管中，加入 20 μ l ddH₂O，用涡旋振荡器混匀。

*如果样品溶液中总谷胱甘肽的浓度范围未知，可梯度稀释样品溶液。

2. GSSG Standard Solution 的制备

1) 分别取 100 μ l 的 100 μ mol/l GSSG Standard Solution 和 300 μ l 0.5%SSA 溶液至微管中，混合制备终浓度为 25 μ mol/l 的 GSSG Standard Solution。用 0.5% SSA 溶液按图 2 中步骤进行梯度稀释以制备成下列 GSSG Standard Solution，浓度依次为：25.0, 12.5, 6.25, 3.13, 1.57, 0.78 和 0 μ mol/l。

2) 在上述 GSSG Standard Solution 中加入 20 μ l Masking Solution，用涡旋振荡器混匀。

3. GSH Standard Solution 的制备

1) 分别取 100 μ l 浓度为 200 μ mol/l 的 GSH Standard Solution 和 300 μ l 0.5%的 SSA 溶液至微管中，混合制备终浓度为 50 μ mol/l GSH Standard Solution。用 0.5% SSA 溶液进行梯度稀释以制备成下列 GSH Standard Solution，浓度依次为：50.0, 25.0, 12.5, 6.25, 3.13, 1.57 和 0 μ mol/l。

2) 在配制好的 200 μ l GSH Standard Solution 中加入 20 μ l ddH₂O，用涡旋振荡器混匀。

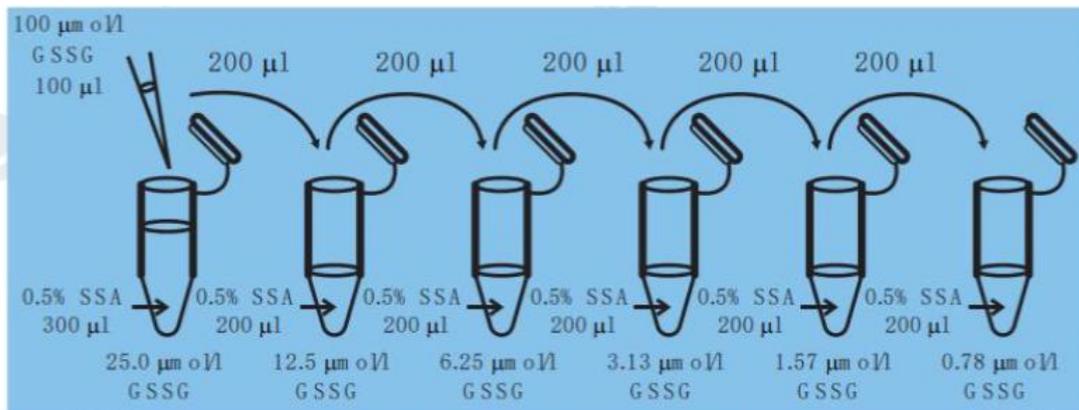


图2. GSSG Standard Solution的制备

4. 检测

1) 每孔加入 40 μ l GSSG Standard Solution, GSH Standard Solution, GSSG 样品或 GSH 样品。

* 建议每个样品重复 3 次，以获得准确的数据。

2) 每孔加入 60 μ l Buffer Solution。

3) 在 37°C 培养 1 h。

* 培养时盖上盖子以防止溶液在培养过程中蒸发。

4) 每孔加入 60 μ l Substrate Working Solution。

5) 每孔加入 60 μ l Enzyme/Coenzyme Working Solution。

* 加入 Enzyme/ Coenzyme Working Solution 后，反应立即开始。建议用多通道移液器操作以减少各孔间误差。

6) 在 37°C 培养 10min。

* 如果选择 Kinetics 法，请选择“Kinetic”模式。

* 在反应开始后的 10min，OD 值呈线性增长，因此可以采用 Kinetic 法或 Pseudo-Endpoint 法测定谷胱甘肽浓度(测定 5-10min 内的某个时间点的 OD 值，不需要终止反应)



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

- 7) 用酶标仪在 405nm 或 415nm 下测定吸光度。
- 8) 用 GSSG 标准曲线测定所得 GSSG 样品溶液中的 GSSG 浓度。
- 9) 用 GSH 标准曲线测定所得 GSH 样品溶液中总谷胱甘肽(GSH+GSSG)的浓度。
谷胱甘肽浓度可以采用Kinetic法或Pseudo-Endpoint法测定
Pseudo-Endpoint法: $\text{Glutathione(GSH, GSSG)} = (\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{blank}}^{\text{a}}) / \text{Slope}^{\text{b}}$
Kinetic法: $\text{Glutathione (GSH, GSSG)} = (\text{Slope}_{\text{sample}}^{\text{c}} - \text{Slope}_{\text{blank}}^{\text{a,c}}) / \text{slope}^{\text{b}}$
 - a) 采用图3中的A1-A3孔或A7-A9孔的OD值。
 - b) Slope为标准品采用Kinetic法或Pseudo-Endpoint法测定得到的曲线斜率。
 - c) Slope_{sample}(或Slope_{blank})为每个样品(或Blank)采用Kinetic法测定得到的曲线斜率。

* 如果测定样品是由原始样品稀释得来, 则将上述测定值乘以稀释倍数, 以计算原始样品的谷胱甘肽浓度。
- 10) GSH 浓度使用以下公式计算【总谷胱甘肽(GSH+GSSG)和 GSSG】
 $\text{GSH} = \text{Total Glutathione(GSH+GSSG)} - \text{GSSG} \times 2$

干扰物:

一些还原剂如抗坏血酸, β -巯基乙醇, 二巯苏糖醇(DTT)和半胱氨酸, 或巯基反应性化合物如马来酰亚胺化合物会干扰谷胱甘肽测定。因此在样品制备过程中应避免使用这些物质。

注意事项:

1. 请先将本试剂盒恢复至室温后再使用。
2. 建议每组样品设定 3 个复孔, 以便得到更准确的数据。
3. 由于加入 Enzyme/Coenzyme Working Solution 之后会立刻产生显色反应, 因此尽量使用多通道移液器以减少各孔之间的误差。
4. 如不知道样品中总谷胱甘肽含量的浓度范围, 就请准备多个浓度梯度的样品溶液。
5. 试剂盒中有带铝盖的玻璃管, 请小心拿取。

保存: 2-8°C 保存。请先将本试剂盒恢复至室温后再使用。



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