

## Servicebio® 总谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽检测试剂盒

目录号：G4304

### 产品信息

| 产品名称               | 产品编号      | 规格  |
|--------------------|-----------|-----|
| 总谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽检测试剂盒 | G4304-48T | 48T |
|                    | G4304-96T | 96T |

### 产品描述

谷胱甘肽（谷氨酰-半胱氨酰-甘氨酸）是一种由 3 个氨基酸残基组成的小肽，广泛存在于机体中。谷胱甘肽以还原型谷胱甘肽（GSH）和氧化型谷胱甘肽（GSSG）2 种不同的形式存在，并且可以在一定条件下互相转换。GSH 是动物细胞中重要的抗氧化剂，且是绝大多数细胞巯基的主要来源。在生理条件下，由于 GSSG 会被谷胱甘肽还原酶酶促还原，因此，GSH 是机体内主要存在形式。

本试剂盒利用谷胱甘肽还原酶将 GSSG 还原成 GSH，再通过 GSH 与 DTNB 反应，生成 TNB 和 GSSG。其中产生的 TNB 与总谷胱甘肽呈现正相关性，因此，可通过测定 TNB 产生量来评估总谷胱甘肽（T-GSH）的量。同时本试剂盒中提供 GSH 清除剂，可用其去除样品中原有 GSH，剩余的 GSSG 在谷胱甘肽还原酶的作用下再次转换生成 GSH，然后和 DTNB 反应，从而测得 GSSG 含量。

### 储存与运输

冰袋运输；-20℃避光保存，6 个月有效。

### 试剂盒组成

| Component Number | Component        | G4304-48T | G4304-96T |
|------------------|------------------|-----------|-----------|
| G4304-1          | 蛋白去除试剂           | 10 mL     | 20 mL     |
| G4304-2          | 谷胱甘肽标准品（GSSG 粉末） | 1 支       | 2 支       |
| G4304-3          | 谷胱甘肽检测缓冲液        | 7.5 mL    | 15 mL     |
| G4304-4          | 谷胱甘肽还原酶          | 0.5 mL    | 1 mL      |
| G4304-5          | 检测探针             | 50 μL     | 100 μL    |
| G4304-6          | 底物               | 1 mL      | 2×1 mL    |
| G4304-7          | GSH 清除剂          | 300 μL    | 600 μL    |
| 产品说明书            |                  | 1 份       |           |

注意：如果需要同时检测 T-GSH 和 GSSG，试剂盒检测次数为对应规格的一半。

### 操作步骤

#### 1. 样品以及前准备：

##### 1.1. 样品前处理

- 1.1.1. 血浆、血清样品：1 比 4 比例加入**蛋白去除试剂**，充分混匀；4℃，10000 g 离心 10-15 min，取上清用于后续检测；
- 1.1.2. 组织样品：添加**蛋白去除试剂**到组织中进行匀浆裂解（重量g：体积mL为 1：9）；匀浆裂解后，4℃，10000 g 离心 10-15 min，取上清用于后续检测；
- 1.1.3. 细胞样品：细胞收集后，使用**蛋白去除试剂**重悬细胞，大约每  $1 \times 10^7$  个细胞加 100-200 μL 试剂，对其进行超声或冰上裂解 10-20 min；处理后，4℃，10000 g 离心 10-15 min，取上清用于后续检测；

##### 1.2. 标准品配置和准备：

- 1.2.1. **谷胱甘肽标准品（GSSG粉末）**在低速离心机上离心，确保粉末都在管底；使用 500 μL

无菌超纯水溶解，配制成谷胱甘肽标准品（GSSG，1 mmol/L），建议分装后-20℃保存，1个月内用完；

1.3. 蛋白去除试剂和超纯水按 1: 9 进行混合，并用其对谷胱甘肽标准品（1 mmol/L）进行梯度稀释（例如可设置为 40/20/10/5/2.5 μmol/L），与待测样品进行后续检测后，用于标准曲线法数据分析。

1.4. 将谷胱甘肽检测缓冲液：谷胱甘肽还原酶：检测探针=150:10:1，配置成谷胱甘肽检测工作液；

## 2. 总谷胱甘肽（T-GSH）检测：

2.1. 对总谷胱甘肽检测样品进行前处理（注意：因为GSSG检测需要对样品进行前处理工作，为了确保体系的一致性，此处需对样品进行同体系前处理后，再进行总谷胱甘肽检测）；

|               | 标准管   | 空白管   | 样品管   |
|---------------|-------|-------|-------|
| 谷胱甘肽标准品       | 50 μL |       |       |
| PBS或水         | 5 μL  | 55 μL | 5 μL  |
| 待测样品          |       |       | 50 μL |
| 震荡混匀，室温孵育 1 h |       |       |       |

2.2. 参考下表进行总谷胱甘肽检测（此处待测样品，为 2.1 步骤处理过的样品）；

|                                              | 标准管    | 空白管    | 样品管    |
|----------------------------------------------|--------|--------|--------|
| 谷胱甘肽标准品                                      | 20 μL  |        |        |
| PBS或水                                        |        | 20 μL  |        |
| 待测样品                                         |        |        | 20 μL  |
| 谷胱甘肽检测工作液                                    | 160 μL | 160 μL | 160 μL |
| 混匀孵育 5 min                                   |        |        |        |
| 底物                                           | 20 μL  | 20 μL  | 20 μL  |
| 震板 1 min，室温（25℃）孵育 20 min，使用酶标仪检测 412 nm处吸光度 |        |        |        |

## 3. 氧化型谷胱甘肽（GSSG）检测：

3.1. 参考下表对还原型谷胱甘肽进行清除处理；

|               | 标准管   | 空白管   | 样品管   |
|---------------|-------|-------|-------|
| 谷胱甘肽标准品       | 50 μL |       |       |
| PBS或水         |       | 50 μL |       |
| 待测样品          |       |       | 50 μL |
| GSH清除剂        | 5 μL  | 5 μL  | 5 μL  |
| 震荡混匀，室温孵育 1 h |       |       |       |

3.2. 参考下表对氧化型谷胱甘肽进行检测（此处待测样品，为 3.1 步骤处理过的样品）

|                                              | 标准管    | 空白管    | 样品管    |
|----------------------------------------------|--------|--------|--------|
| 谷胱甘肽标准品                                      | 20 μL  |        |        |
| PBS或水                                        |        | 20 μL  |        |
| 待测样品                                         |        |        | 20 μL  |
| 谷胱甘肽检测工作液                                    | 160 μL | 160 μL | 160 μL |
| 混匀孵育 5 min                                   |        |        |        |
| 底物                                           | 20 μL  | 20 μL  | 20 μL  |
| 震板 1 min，室温（25℃）孵育 20 min，使用酶标仪检测 412 nm处吸光度 |        |        |        |

#### 4. 数据分析：

4.1.1. 根据梯度稀释的标准组值-空白组值数据使用Excel等软件绘制T-GSH和GSSG标准曲线： $Y_1 = a_1 X_1 + b_1$  和： $Y_2 = a_2 X_2 + b_2$ ；

4.1.2. 血液样品T-GSH和GSSG含量计算：

$$\text{单位血清样品T-GSH含量}(\mu\text{mol/L}) = (\Delta A_1 - b_1) \div a_1 \times 2^* \times 5^* \times f$$

$$\text{单位血清样品GSSG含量}(\mu\text{mol/L}) = (\Delta A_2 - b_2) \div a_2 \times 5^* \times f$$

4.1.3. 组织样品T-GSH和GSSG含量计算：

$$\text{单位组织样品T-GSH含量}(\mu\text{mol/kg}) = (\Delta A_1 - b_1) \div a_1 \times V \div m \times 2^* \times f$$

$$\text{单位组织样品GSSG含量}(\mu\text{mol/kg}) = (\Delta A_2 - b_2) \div a_2 \times V \div m \times f$$

4.1.4. 细胞样品T-GSH和GSSG含量计算：

$$\text{单位细胞样品T-GSH含量}(\mu\text{mol}/10^9\text{cell}) = (\Delta A_1 - b_1) \div a_1 \times V \div n \times 2^* \times f$$

$$\text{单位细胞样品GSSG含量}(\mu\text{mol}/10^9\text{cell}) = (\Delta A_2 - b_2) \div a_2 \times V \div n \times f$$

注意：还原型谷胱甘肽含量 ( $\mu\text{mol/L}$ ) = 总谷胱甘肽含量 ( $\mu\text{mol/L}$ ) - 2×氧化型谷胱甘肽 ( $\mu\text{mol/L}$ )

注解： $Y_1$  和  $Y_2$  分别为T-GSH和GSSG标准组OD值-空白组OD值； $X_1$  和  $X_2$  分别为T-GSH和GSSG含量； $a_1$  和  $a_2$  分别为T-GSH和GSSG标准曲线斜率； $b_1$  和  $b_2$  分别为T-GSH和GSSG标准曲线截距； $\Delta A_1$  和  $\Delta A_2$  分别为T-GSH和GSSG：样品组OD值-空白OD值； $5^*$  为血清和蛋白去除试剂混合后稀释的倍数； $2^*$  为GSSG换算成GSH时，需要乘以2； $V$  为匀浆裂解组织或细胞使用的蛋白去除试剂的体积 (mL)； $m$  为组织湿重 (g)； $n$  为细胞量 ( $10^6$  个)； $f$  为稀释倍数。

#### 注意事项

1. 使用前充分溶解并轻轻晃动各类试剂，确保各成分在均匀条件下使用。
2. 不同样品含量不同，请根据实际情况，适当提高或降低样品浓度。
3. 本试剂盒可以根据需要只检测总谷胱甘肽或氧化型谷胱甘肽，也可以都检测。
4. 谷胱甘肽检测工作液和检测探针工作液现配现用。
5. 当最终计算异常，可能是样品GSH清除出现异常，可以视情况提高或降低GSH清除剂使用量或者孵育时间。
6. 初次使用可视情况适当分装储存，以避免反复冻融影响试剂性能。
7. 使用标准曲线法分析数据时，确保标准曲线  $R^2 > 0.99$ 。
8. 还原剂以及巯基活性化合物会严重干扰本试剂盒的测定。
9. GSH清除剂具有刺激性气味，相关操作请于通风橱中进行。
10. 为了您的健康和安全，操作时请穿好实验服、戴好手套。

#### 附录：技术参数

|            |                                                    |
|------------|----------------------------------------------------|
| 检测指标       | 总谷胱甘肽 (T-GSH)、氧化型谷胱甘肽 (GSSG)                       |
| 样品类型       | 血清 (浆)、组织、细胞                                       |
| 检测灵敏度和检测范围 | 0.78 $\mu\text{mol/L}$ ; 0.78-40 $\mu\text{mol/L}$ |
| 回收率        | 95-105%                                            |
| 批内 CV      | < 5%                                               |
| 批间 CV      | < 5%                                               |

本产品仅供科研用途，不用于临床诊断！

版本号：V2.0-202311