组织细胞总谷胱甘肽检测试剂盒　　E2015

描述：组织细胞总谷胱甘肽检测试剂盒（Total Glutathione Assay Kit）是一种灵敏简单的检测总谷胱甘肽的试剂盒。总谷胱甘肽包括还原型谷胱甘肽（GSH）和氧化型谷胱甘肽（GSSG）。GSH 是细胞中巯基的主要来源，对于维护蛋白巯基适当的氧化还原状态有重要作用，动物细胞中 GSH 占总谷胱甘肽比例约 90-95%。

原理：GSH 可以和 DTNB 反应生成黄色的 TNB 和 GSSG，利用该反应可以通过测定生成 TNB 的吸光度（A_{412nm}）定量检测 GSH；另外谷胱甘肽还原酶可以将 GSSG 还原为 GSH，在反应体系中增加谷胱甘肽还原酶反应，可以测定总谷胱甘肽，并能通过酶反应将 GSSG 反复还原为 GSH，从而极大提高 GSH 和 DTNB 显色反应对 GSH 检测的灵敏度。

反应示意图如下：

$$\mathbf{2GSH + DTNB \longrightarrow GSSG + 2TNB}$$

$$\mathbf{NADPH + H^+ + GSSG \xrightarrow{GR} NADP^+ + 2GSH}$$

本试剂盒合并两个反应如下：

$$\mathbf{DTNB + H^+ + NADPH \xrightarrow[GSH/GSSG]{GR} NADP^+ + 2TNB}$$

本试剂盒以 GSH 为标准品检测线性范围为 1.25-40μM，灵敏度≤1.25μM。

适用：本试剂盒能够检测动物组织、培养细胞和多种其它生物样本中的总谷胱甘肽含量。

组成：

组份名称	规格	数量
总谷胱甘肽检测缓冲液	50ml/瓶	1
还原型谷胱甘肽（GSH）	6mg/管	1
DTNB	4mg/管	1
谷胱甘肽还原酶	150μl/管	1
NADPH	5mg/管	1
蛋白去除试剂 S	0.5 g/管	1
组织细胞裂解液	100ml/瓶	1
DMSO	1.2ml/管	1

储存条件：-20℃储存，一年有效。NADPH 配制成溶液后，可适当分装，-70℃储存。GSH 和 DTNB 溶解后，-20℃储存。蛋白去除试剂 S 配制成溶液后 4℃储存。

所需设备：酶标仪，最佳工作波长 412nm

操作步骤：

1. 样品的准备

蛋白沉淀试剂溶液配制：请于样本准备前，将试剂盒中提供的 0.5g 蛋白沉淀试剂 S 溶于 10ml 纯水中，如果一次实验不需要使用 10ml，请根据需要称取配制成 5%的水溶液。

1.1 细胞样品的准备：收集新鲜细胞，PBS 洗涤细胞一次，离心收集细胞，吸尽上清。加入 200 μl 的预冷

的组织细胞裂解液，冰浴匀浆或超声裂解细胞。4℃，10000g 离心 10 分钟。取上清和蛋白沉淀试剂 S 溶液 1:1 混合并涡旋。4℃，10000g 离心 10 分钟。取上清用于总谷胱甘肽的测定。不立即测定的样品可以-70℃保存。如果样品中总谷胱甘肽超出测定范围，可利用蛋白沉淀试剂 S 溶液适当稀释后测定，稀释倍数可达 10-20 倍。

1.2 组织样品的准备：利用含 1mM EDTA 的 PBS 灌流或漂洗组织，去除组织中的血液，然后取约 20mg 组织，加入 400μl 的预冷的组织细胞裂解液，冰浴匀浆。4℃，10000g 离心 10 分钟。取上清和蛋白沉淀试剂 S 溶液 1:1 混合并涡旋。4℃，10000g 离心 10 分钟。取上清用于总谷胱甘肽的测定。不立即测定的样品可以-70℃保存。如果样品中总谷胱甘肽超出测定范围，可利用蛋白沉淀试剂 S 溶液适当稀释后测定，稀释倍数可达 10-20 倍。

2. 试剂盒的准备

2.1 GSH 储备液的配制：在本试剂盒提供的 6mg GSH 中加入 1ml 的纯水，溶解并混匀，即为 GSH 储备液，浓度为 20mM。

2.2 DTNB 储备液的配制：在本试剂盒提供的 4mg DTNB 中加入 1ml 本试剂盒提供的 DMSO 溶解并混匀，即为 DTNB 储备液，浓度为 10mM。

2.3 NADPH 储备液的配制：在本试剂盒提供的 5mg NADPH 中加入 1ml 纯水，溶解并混匀，即为 NADPH 储备液，浓度为 5mg/ml。

2.4 总谷胱甘肽检测工作液的配制：根据待测样品数参考下表配制适当量的总谷胱甘肽检测工作液，表中试剂按比例混合后即为总谷胱甘肽检测工作液。

	1 个样品	10 个样品	50 个样品
总谷胱甘肽检测缓冲液	150μl	1.5ml	7.5ml
DTNB 储备液	5μl	50μl	250μl
谷胱甘肽还原酶	1μl	10μl	50μl

2.5 NADPH 工作液的配制：取 NADPH 储备液，利用总谷胱甘肽检测缓冲液稀释 10 倍，配制为 0.5mg/ml 的 NADPH 工作液。每检测一个样品需要 50μl 的 0.5mg/ml NADPH。

3. 标准品的准备

将 20mM 的 GSH 储备液用蛋白去除试剂 S 溶液稀释成 20、10、5、2.5、1.25、0.62μM 浓度的 GSH 溶液，用于标准曲线测定。由于 GSH 在蛋白去除 S 溶液中不够稳定，每次测定需新鲜配制系列标准品稀释液。

4、 测定方法

4.1 参考下表，使用 96 孔板，依次加入总谷胱甘肽检测工作液、样品或标准品后，混匀，25℃或室温孵育 2 分钟。

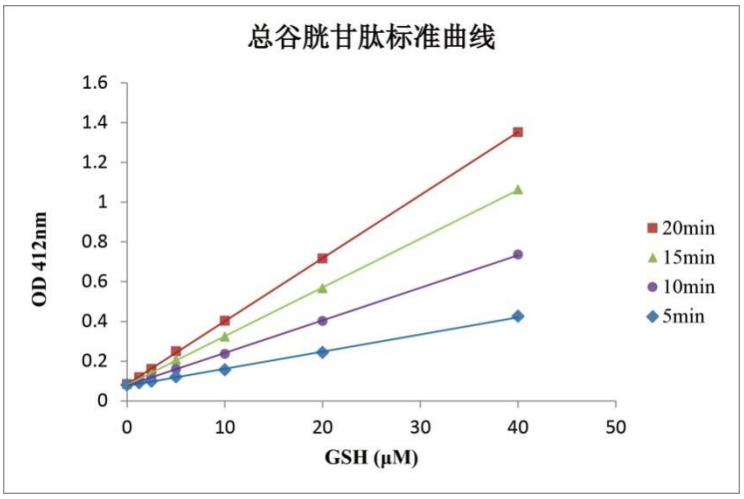
	空白对照	标准曲线	样品
总谷胱甘肽检测工作液	150 μl	150 μl	150 μl
标准品	—	10 μl	—
样品	—	—	10 μl
蛋白沉淀试剂 S 溶液	10 μl	—	—
25℃或室温孵育	2 min	2 min	2 min
NADPH 工作液	50 μl	50 μl	50 μl
25℃孵育	20 min	20 min	20 in

4.2 参考上表，各孔加入 NADPH 工作液 50μl，25℃孵育 20 分钟。

4.3 各孔加入 NADPH 工作液 50μl 启动谷胱甘肽还原酶反应后，立即开始计时，并在 5、10、20 分钟等时间点测定 A_{412nm}。如果样品吸光度较低，可适当降低标准品浓度，延长反应时间进行样品测定。

5. 数据处理

利用 GSH 标准品浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标制作标准曲线，并获得横纵坐标之间的函数关系式，然后利用标准曲线和各样品的吸光度值计算样品的总谷胱甘肽浓度。由于有多个时间点的标曲，可以选择标曲线性最好的时间点计算样品总谷胱甘肽浓度。对于细胞和组织样品，可以根据样品中蛋白浓度测定，计算每毫克蛋白中总谷胱甘肽的含量。GSH 标曲测定如下图所示：



参考文献

1.Akerboom, T.P., and Sies, H., 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. Methods Enzymol., 77, 373-382.

2. Nair, S. et al., 1991. Flow cytometric monitoring of glutathione content and anthracycline retention in tumor cells. Cytometry, 12, 336-342.

注意事项

1. 本试剂盒检测涉及氧化还原反应，很多氧化剂和还原剂都会干扰试剂盒的测定，特别是巯基乙醇、DTT 等含有巯基的试剂会严重干扰本试剂盒的测定，请尽量避免。
2. 严格控制反应的温度和反应时间，并在每次测定同时利用标准品制作标准曲线，样品中谷胱甘肽浓度过低时，可适当延长反应时间。
3. NADPH 在溶液中容易分解，要严格按储存条件保存。
4. 初次使用试剂盒时，粉末试剂和小体积液体试剂请适当离心后使用。
5. 本产品仅限专业人员用于科学研究，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。
6. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。