谷胱甘肽测试盒说明书

（ 测总谷胱甘肽、还原型谷胱甘肽、氧化型谷胱甘肽 微板法）

免责声明：测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

一、测定原理：

利用 DTNB 的循环反应，测定组织和体液中的总谷胱甘肽和氧化型谷胱甘肽的含量。

二、试剂盒组成和试剂配制（注：如需同时测定 T-GSH 和 GSSG，则试剂盒 48T 只能测到 24 样，96T 只能测到 48 样）（试剂盒有效期 6 个月）

	组份	48T A061-1-1	96T A061-1-2	保存
试剂一	底物一粉剂	粉剂×1支	粉剂×2支	4℃保存
	底物一缓冲液	5mL×1瓶	5mL×2瓶	4℃保存
试剂一应用液的配制：临用前将 1 瓶缓冲液加到 1 支粉剂中，充分溶解，4℃避光保存				
试剂二	底物二贮备液	25μL×1支	25μL×2支	-20℃保存
	底物二稀释液	500μL×1支	500μL×2支	-20℃保存
试剂二应用液配制：临用前按**试剂二贮备液：稀释液=1：19** 的比例混合，涡旋混匀，现用现配，需多少配多少。				
试剂三	粉剂	粉剂×3支	粉剂×5支	-20℃保存
	稀释液	1mL×3支	1mL×5支	4℃保存
试剂三应用液的配制：临用前每支粉剂中加1支**稀释液**，充分溶解后使用，现用现配，需多少配多少。**注:试剂三粉剂量较少,可能附着于管内壁及盖上(并非空管),使用时可将其4000rpm离心2分钟再使用。**				
试剂四	粉剂	粉剂×3瓶	粉剂×5瓶	4℃保存
试剂四的配制：临用前每瓶粉剂加蒸馏水10mL，可加热使其充分溶解；冷却至室温后作匀浆介质用，用不完的4℃可保存3天。				
试剂五	贮备液	15μL×1支	30μL×1支	4℃保存
	试剂五溶剂	150μL×1瓶	300μL×1瓶	4℃保存
试剂五应用液的配制：临用前，按**贮备液：试剂五溶剂=1：9** 的比例混合，涡旋混匀，充分溶解，现用现配。				
试剂六	液体	250μL×1支	500μL×1支	4℃保存
[注]：试剂六很粘稠，取样时要缓慢仔细。				
GSSG 标准品	6.13mg	粉剂×1瓶	粉剂×1瓶	4℃保存
1mmol/L的GSSG贮备液配制：临用前加入10mL蒸馏水溶解，配成1mmol/L的GSSG贮备液，分装后-20℃保存一个月有效。				
50μmol/L 的 GSSG 标准品应用液配制：将 1mmol/L 的 GSSG 贮备液用试剂四溶液 20 倍(1:19)稀释制备成 50μmol/L 的 GSSG 标准品应用液，现用现配。				
GSH 标准品	3.07mg	粉剂×1瓶	粉剂×1瓶	4℃保存
1mmol/L 的 GSH 贮备液配制：临用前加入 10mL 蒸馏水，配成 1mmol/L 的 GSH 贮备液，分装后-20℃保存一个月有效。				
50μmol/L 的 GSH 标准品应用液配制：将 1mmol/L 的 GSH 贮备液用试剂四溶液 20 倍(1:19)稀释制备成 50μmol/L 的 GSH 标准品应用液，现用现配。				

三、所需仪器及试剂：

可调 405nm 波长的酶标仪及 96 孔板（附送一块），37℃水浴锅或恒温箱，涡旋混匀器，秒表，蒸馏水（或蒸馏水）。

四、样本测试前处理（除蛋白）

1、全血样本：

取血，用肝素或者 EDTA 抗凝。取 100μL 抗凝的全血，加入 400μL 的新配的试剂四溶液（样本稀释倍数为 5 倍，如果样本量少，可按 1：4 的比例相应缩小），漩涡混匀 30 秒后，4℃静置 5 分钟。3500 转/分钟，离心 10 分钟。取上清 4℃备用；如果需要过夜请于-20℃保存。

2、红细胞样本：

取血，用肝素或者 EDTA 抗凝。**立即** 2000 转/分钟，离心 10 分钟，小心吸去上层的血浆层和红细胞层表面乳白色的白细胞层。取 100μL 下层红细胞，加入 400μL 新配的试剂四（样本稀释倍数为 5 倍，如果样本量少可按 1:4 的比例相应缩小），漩涡混匀 30 秒后，4℃静置 5 分钟。3500 转/分钟，离心 10 分钟。取上清备用（4℃存放）；如果需要过夜请于-20℃保存。

3、血清（浆）样本：

取血，用肝素或者 EDTA 抗凝。**立即** 2000 转/分钟，离心 10 分钟，小心吸取上层淡黄色的血浆层。取 100μL 血浆，立即加入 400μL 新配的试剂四（样本稀释 5 倍）（如果样本量少，可按 1：4 的比例相应缩小），漩涡混匀 30 秒后，4℃静置 5 分钟。3500 转/分钟，离心 10 分钟取上清 4℃备用；如果需要过夜请于-20℃保存。

4、组织匀浆：

取新鲜组织，在生理盐水中漂洗，吸去组织表面多余的水分。准确称取组织重量，按照重量体积比为 1:4 加入试剂四进行组织匀浆（如 0.1g 组织加 0.4mL 新配的试剂四），（如果样本量少，可按 1：4 的比例相应缩小），操作在冰浴中进行，制备好的组织匀浆（匀浆组织浓度为 20%），3500 转/分钟，离心 10 分钟取上清备用（放置 4℃）；如果需要过夜请于-20℃保存。

5、普通细胞样本：

将收集好的细胞，用等渗的 PBS 清洗 1～2 次后，低速（1000-2000 转/分钟）离心收集细胞沉淀，再加入 0.3mL 试剂四，冰浴中超声或手动研磨破碎细胞，3500 转/分钟，离心 10 分钟取上清备用（放置 4℃）；如需过夜请于-20℃保存。

五、操作过程：

1、T-GSH 的测定步骤：

T-GSH 操作步骤表（96 孔板中操作）		
	标准孔	测定孔
50μmol/L GSH 标准品（μL）	10	
样本（μL）		10
试剂一应用液（μL）	100	100
试剂二应用液（μL）	10	10
轻轻摇动孔板使试剂充分混匀，室温（25℃）避光静置 2 分钟		
试剂三应用液（μL）	50	50
加试剂三应用液的同时开始计时，轻轻摇动孔板使试剂充分混匀，置酶标仪中，405nm 处，30 秒时准时读取吸光度值（A1），室温（25℃）避光静置 10 分钟，10 分 30 秒时准时读取吸光度值（A2），计算△A=A2-A1。		

2、GSSG 的测定步骤：

第①步前处理：（离心管中操作）（下表试剂五应用液和试剂六可事先按操作表比例混合，一次性加入反应）

试剂名称	标准管	测定管
50μmol/L GSSG 标准品（μL）	100	
样本（μL）		100
试剂五应用液（μL）	2	2
试剂六（μL）	5	5
漩涡混匀 1 分钟，37℃反应 30 分钟，取 10μL 进行第②步测定		

第②步 GSSG 含量测定：（96 孔板中操作）

试剂名称	标准孔	测定孔
标准品处理液（μL）	10	
样本处理液（μL）		10
试剂一应用液（μL）	100	100
试剂二应用液（μL）	10	10
轻轻摇动孔板使试剂充分混匀，室温（25℃）避光静置 2 分钟		
试剂三应用液（μL）	50	50
加试剂三应用液的同时开始计时，轻轻摇动孔板使试剂充分混匀，置酶标仪中，405nm 处，30 秒时准时读取吸光度值（A1），室温（25℃）避光静置 10 分钟，10 分 30 秒时准时读取吸光度值（A2），计算△A=A2-A1。		

六、标准曲线的制备：（用标准曲线计算时做，否则可不做）

1、 GSH 标准曲线：

①、取 1mmol/L 的 GSH 贮备液，用试剂四溶液稀释成不同

的浓度：0μmol/L、12.5μmol/L、25μmol/L、50μmol/L、100μmol/L，置于 4℃待测。

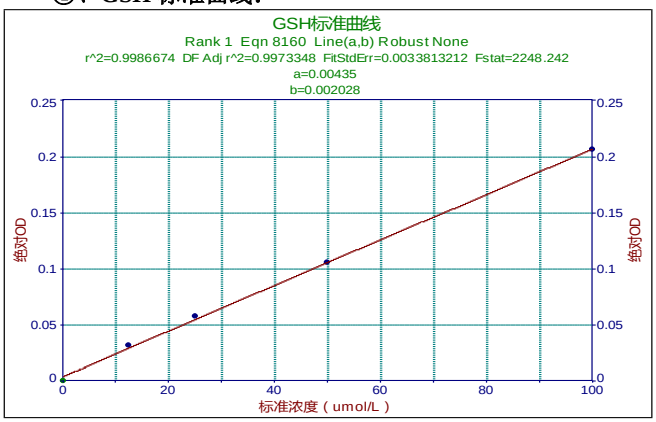
②、操作表：（96 孔板中操作）

	T-GSH 标准孔
不同的浓度的 T-GSH 标准（μL）	10
试剂一应用液（μL）	100
试剂二应用液（μL）	10
轻轻摇动孔板使试剂充分混匀，室温（25℃）避光静置 2 分钟	
试剂三应用液（μL）	50
加试剂三应用液的同时开始计时，轻轻摇动孔板使试剂充分混匀，置酶标仪中，405nm 处，30 秒时准时读取吸光度值（A1），室温（25℃）避光静置 10 分钟，10 分 30 秒时准时读取吸光度值（A2），计算△A=A2-A1。	

③、测定结果：

GSH 标准浓度	A1	A2	△A
0μmol/L	0.1686	0.1686	0.0000
12.5μmol/L	0.1851	0.2173	0.0322
25μmol/L	0.2005	0.2588	0.0583
50μmol/L	0.2306	0.3374	0.1068
100μmol/L	0.2722	0.4786	0.2064

④、GSH 标准曲线：



2、GSSG 标准曲线：

①、取 1mmol/L GSSG 贮备液，用试剂四溶液稀释成 0μmol/L、12.5μmol/L、25μmol/L、50μmol/L、100μmol/L，置于 4℃待测。

②、操作表：

a、GSSG 前处理：（离心管中操作）（下表试剂五应用液和试剂六可事先按操作表比例混合，一次性加入反应）

	GSSG 标准管
不同浓度的 GSSG 标准（μL）	100
试剂五应用液（μL）	2
试剂六（μL）	5
漩涡混匀 1 分钟，37℃反应 30 分钟，取 10μL 进行“b”反应	

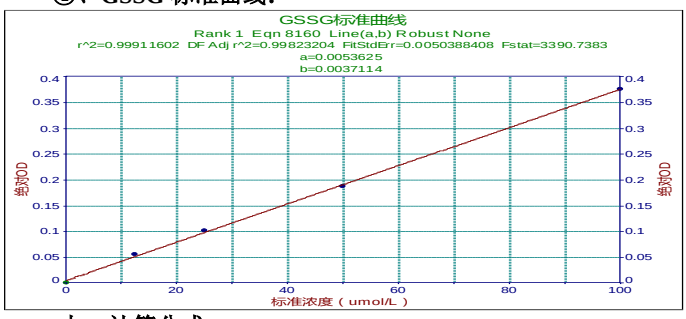
b、GSSG 含量测定：（96 孔板中操作）

	GSSG 标准孔
不同浓度的 GSSG 标准前处理液（μL）	10
试剂一应用液（μL）	100
试剂二应用液（μL）	10
轻轻摇动孔板使试剂充分混匀，室温（25℃）避光静置 2 分钟	
试剂三应用液（μL）	50
加试剂三应用液的同时开始计时，轻轻摇动孔板使试剂充分混匀，置酶标仪中，405nm 处，30 秒时读取吸光度值（A1），室温（25℃）避光静置 10 分钟，10 分 30 秒时读取吸光度值（A2），计算△A=A2-A1。	

③、测定结果：

GSSG 标准浓度	A1	A2	△A
0μmol/L	0.1640	0.1640	0.0000
12.5μmol/L	0.1720	0.2302	0.0582
25μmol/L	0.1744	0.2799	0.1055
50μmol/L	0.1799	0.3781	0.1982
100μmol/L	0.1906	0.5679	0.3773

④、GSSG 标准曲线：



七、计算公式：

1、公式计算法：(不做标曲时的计算方法)

$$T-GSH含量（\mu mol/L）=\frac{T-GSH测定\Delta A值}{T-GSH标准\Delta A值}\times C_{GSH标准}\times N$$

$$GSSG含量（\mu mol/L）=\frac{GSSG测定\Delta A值}{GSSG标准\Delta A值}\times C_{GSSG标准}\times N$$

还原型谷胱甘肽（GSH）含量= T-GSH 含量 - 2×GSSG 含量

注：$C_{GSH\ 标准}$： T-GSH 标准品浓度，50μmol/L；

$C_{GSSG\ 标准}$： GSSG 标准品浓度，50μmol/L；

N： 样本测试前稀释倍数。

2、标准曲线法：

①、根据总谷胱甘肽（T-GSH）标准曲线查找出对应的总谷胱甘肽（T-GSH）浓度，再乘以样本测定前的稀释倍数，计算出样本中总谷胱甘肽（T-GSH）含量。

②、根据氧化型谷胱甘肽（GSSG）标准曲线查找出对应的氧化型谷胱甘肽（GSSG）浓度，再乘以样本测定前的稀释倍数，计算出样本中氧化型谷胱甘肽（GSSG）含量。

③、还原型谷胱甘肽（GSH）含量= T-GSH 含量 - 2×GSSG 含量。

八、实验注意点：

1、样本中 GSH 代谢很快，故收集样本后必须尽快用试剂四溶液处理，以减少样本中 GSH 的损失。经试剂四溶液处理后的上清，其中 GSH 含量可以在-20℃条件下保存 6 个月。

2、每个样本包括标准液反应时间 10 分钟必须准确计时。

3、样本在测定前可以取 1～2 个样本先做预试，如果吸光度偏高（△A＞0.2），要用试剂四溶液将样本稀释到适宜的浓度，以使得样本中 T-GSH/GSSG 的含量在标准曲线的线性范围内**（组织匀浆一般为 10%~20%浓度，红细胞一般 2～5 倍稀释，血浆原液操作）。**

九、测定意义：

谷胱甘肽在机体内的广泛分布和多功能性愈来愈引起科研工作者的注意。它在许多重要的生物体现象中起着直接或间接的作用，因而涉及到许多不同的研究课题，如酶反应机理，蛋白质和 DNA 等大分子的生物合成、中间代谢、辐射、肿瘤、免疫、环境毒素和老化等。特别是近年来许多研究课题都涉及到细胞对活性氧和自由基的防御作用。其中测定生物样品中，特别是血清（浆）中还原型和氧化型谷胱甘肽（GSH 和 GSSG）含量变化，是机体氧化物牵累的重要指标。