请在使用前仔细阅读说明书

（Total Glutathione Quantification Kit）

——总谷胱甘肽测定试剂盒

（货号：T419，规格：100次）

概述：

谷胱甘肽（GSH）是动物组织，植物组织，细菌和酵母内最为丰富的巯基（SH）化合物。GSH 具有多种功能，如抵御活性氧和维持蛋白巯基等。在这些反应中，GSH 转变为 GSSG（二硫代谷胱甘肽：谷胱甘肽的氧化型）。由于 GSSG 会被谷胱甘肽还原酶酶促还原，因此 GSH 是机体内的主要存在形式。

DTNB(5,5'-二硫基-双(2-硝基苯甲酸))，一种 Ellman 试剂，可以用来检测巯基化合物。1985 年，Dr.M.E.Anderson 建立了利用谷胱甘肽在 DTNB 和谷胱甘肽还原酶作用下循环反应来检测谷胱甘肽含量的高灵敏度的方法。DTNB 和谷胱甘肽(GSH)反应，生成 2-nitro-5-thiobenzoic acid（2-硝基-5-硫代苯甲酸）以及 GSSG。由于 2-硝基-5-硫代苯甲酸为一种黄色产物，通过测量其在 412 nm 处的吸光度就能确定样品中 GSH 的浓度。GSSG 在谷胱甘肽还原酶作用下生成 GSH，然后再和 DTNB 反应再次生成 2-硝基-5-硫代苯甲酸。因此，这种循环反应使得总谷胱甘肽含量的检测灵敏度大大加强了。（图.1）

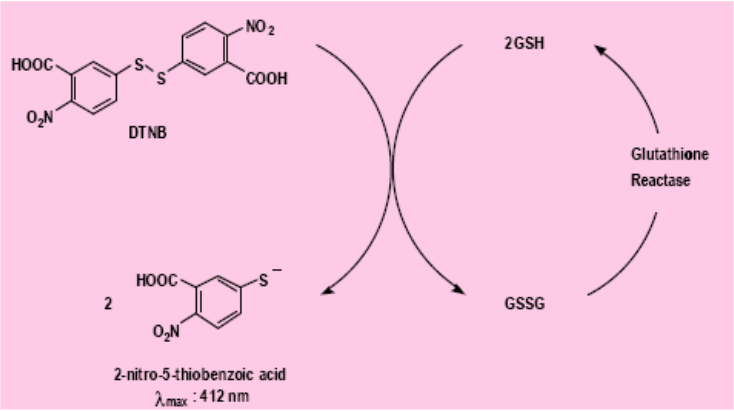


图 1：总谷胱甘肽反应机理

总谷胱甘肽测定试剂盒包含了除用于样品制备以外的其它所有必要的检测试剂。推荐使用 5-磺基水杨酸来去除样品溶液中的蛋白以及防止 GSH 氧化型和 γ-谷氨酰转肽酶反应。样品的最佳制备方法要根据样品而异，所以请先查阅相关资料。运用标准的检测方法，该试剂盒能够检测浓度在 1 μM 到 100 μM 之间的总谷胱甘肽。如果要检测较低浓度的谷胱甘肽（如血液样品），可以延长培养的时间。

试剂盒内含：

- Substrate (DTNB)……..2小管
- Enzyme Solution……50 μl × 1小管
- Coenzyme (冷冻干燥)……..2小管
- Standard GSH (冷冻干燥)…..1小管
- Buffer solution……..…..50 ml × 1瓶

所需设备及材料：

- 酶标仪（带有 405 或 415 nm 滤光片）
- 透明 96 孔板
- 20 μl 和 200 μl 的可调式移液器
- 37℃培养箱
- 5-Sulfosalicylic acid (SSA)

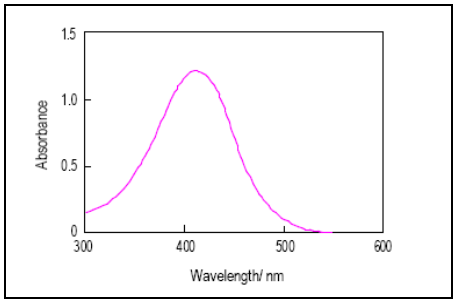


图 2：2-硝基-5-硫代苯甲酸的光谱

存储条件：

未开封的试剂盒可在 0-5℃保存 1 年。Substrate Working Solution、Coenzyme working solution 和 GSH Standard Solution 可在-20℃保存 2 个月，enzyme solution 可在 4℃下保存 2 个月（无需冻融）。

注意事项：

1. 请在室温下使用试剂盒中的试剂。
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Substrate 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. 本试剂盒不适合测定GSSG。
6. 试剂盒中有带铝盖的玻璃管，请小心拿取。

准备 5% 的 5-磺基水杨酸(SSA)：

将 1 g SSA溶解于 19 ml的ddH_2O中。

该溶液存放在 4℃下（在 4℃下能够存放 6 个月）注：本试剂盒中不含该产品。

样品溶液的制备：

以下是对通常样品的处理方法，不同样品之间可能有变动，仅供参考。

如果需要更加详细的操作条件，请查看参考文献 3 (Anderson, 1985)。

细胞（贴壁细胞：5×10^5 cells；白细胞：1×10^6 cells）

1） 4℃，200 ×*g*离心 10 分钟收集细胞，弃上清。
2） 用 300 μl PBS清洗细胞，4℃，200 ×*g*离心 10 分钟，弃上清。
3） 加入 80 μl 10 mM的HCl，反复冻融使细胞溶解。重复该步骤 2 次。
4） 加入 20 μl 5%的SSA，8,000×*g*离心 10 分钟。
5） 将上清移入一支新试管中，进行总谷胱甘肽检测。[a)]

组织（重量：100 mg）

1） 在 0.5-1 ml 5%的SSA中匀化组织。
2） 匀化后的组织样品 8,000×*g*离心 10 分钟。
3） 将上清移入一支新试管中，进行总谷胱甘肽检测。[a)]

血浆

1） 4℃，1,000×*g*离心抗凝处理的血液 10 分钟。
2） 将最上层的血浆移入一支新试管，加入 1/2 体积的 5%的SSA。
3） 4℃，8,000×*g*离心 10 分钟。

4） 将上清移入一支新试管中，进行总谷胱甘肽检测。[a)]

红血球[b)]

1） 4℃，1,000×*g*离心抗凝处理的血液 10 分钟。
2） 弃上清及浅黄色层面的液体。
3） 用 4 倍体积的 5%的SSA溶解红血球。
4） 4℃，8,000×*g*离心 10 分钟。
5） 将上清移入一支新试管中，进行总谷胱甘肽检测。[a)]

a) 在使用样品溶液前，请先用ddH_2O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：

Substrate working solution

加 1.2 ml Buffer Solution 于 1 管 Substrate 中，溶解。
*请确认完全溶解 Substrate
*难溶解时，使用超声或 VORTEX　Mixer(旋涡混合器)
*请将该溶液保存在-20℃条件下（在-20℃下可以保存 2 个月）

Enzyme working solution

用移液器混合 Enzyme solution，吸取 20 μl，将其与 4 ml Buffer solution 混合。
*偶尔在管的内壁和盖子附着酶溶液,请稍微离心后开封。
*请将该溶液保存在 4℃条件下（在 4℃下可以保存 2 个月）

Coenzyme working solution

加 1.2 ml ddH_2O于Coenzyme管中，溶解。
*Coenzyme管是经过减压处理的，请小心打开或者使用注射器来添加ddH_2O。
*请将剩余的溶液保存在-20℃条件下（在-20℃下可以保存 2 个月）

GSH standard solutions

1) 加 2 ml 0.5%的 SSA 于 Standard GSH 管中，溶解后制备成 200 μM 的 GSH standard solution。
*Standard GSH 管作过减压处理，请小心打开或者使用注射器来添加 SSA。
*GSH 粉末难以用肉眼观察到。
*请将该溶液存放在-20℃下（在-20℃下能够存放 2 个月）
2) 如下所示，在每个塑料管中加 100 μl 0.5%SSA。
在第一个塑料管中加入 100 μl　200 μM 的 GSH standard solutions，
混匀后，取 100 μl 溶液加到下一个管子、将其逐级稀释，制备成 GSH standard solutions。
浓度依次为：100 μM，50 μM，25 μM，12.5 μM，6.25 μM，3.13 μM，1.56 μM 和 0。
*所配溶液要在一天内用完。

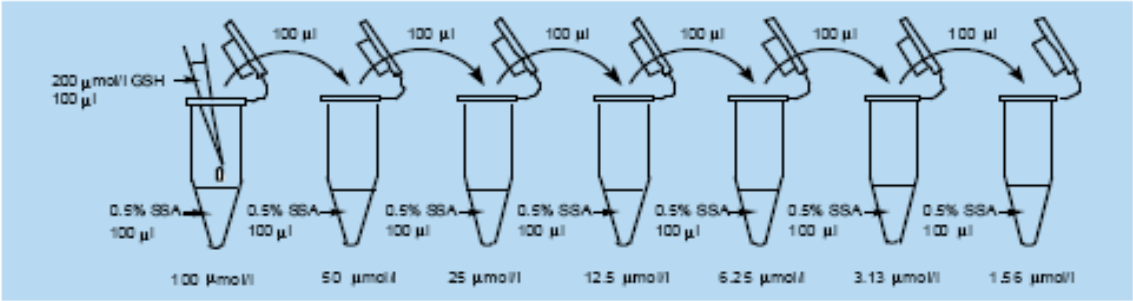


图 3：制备 GSH standard solution

总谷胱甘肽检测（标准法）**(实际操作方法：如图 5)**

检测范围：5-100 µM

1）向每孔中加入 20 µl Coenzyme working solution，120 µl Buffer solution 以及 20 µl Enzyme working solutions。

2）37℃下培养 5 分钟。

3）加入 20 µl GSH standard solution或样品溶液。[a)]

a) 测定前请先用ddH_2O将样品溶液中SSA的浓度调节为 0.5%。高浓度的SSA(>1%)会干扰实验。按照图 4 排列GSH standard solution和样品溶液。如果复孔是 3 个的话，可以测定 24 个样品。

4）37℃下培养 10 分钟。

5）加入 20 µl Substrate working solution，室温下培养 10 分钟。

6）用酶标仪在 405 nm 或 415 nm 下测定吸光度。

7）用标准曲线测定所得样品溶液的GSH浓度。[b)]

b) 由于比色反应很稳定且 OD 值呈线性增长超过 30 分钟，因此可以采用 kinetic 法或 pseudo-endpoint 法测定 GSH 浓度（不停止反应，在 5-10 分钟的固定时间点快速测定 OD 值）。比色反应随时间的变化见图 6。采用 kinetic 法或 pseudo-endpoint 法测定的曲线见图 7,8。

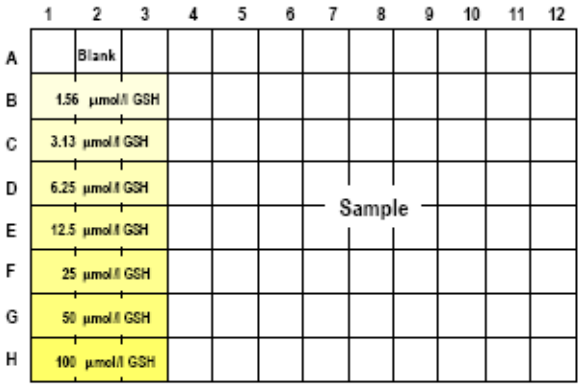
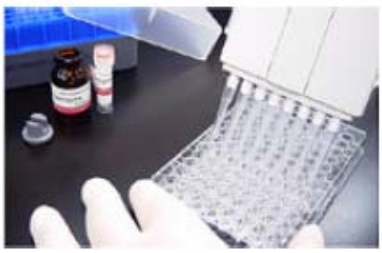
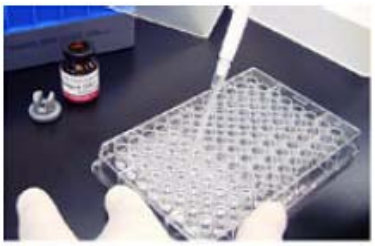


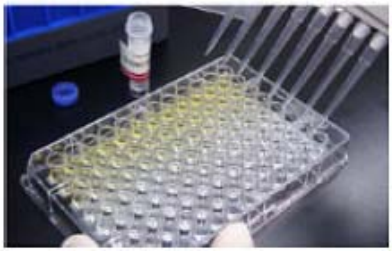
图 4：以上样品孔和空白孔是按照 96 孔板的排列





1)-2) 向各孔中加入coenzyme working solution，solution和enzyme working Solution，并在37℃下培养5分钟。

3)-4) 向各孔中加入GSH standard solution或者，Buffer样品溶液,并在37℃下培养10分钟。



5) 向各孔中加入 substrate standard solution，并在 37℃下培养 10 分钟。

6) 测定 405 或 415 nm 处的 O.D.值。

图 5 ：总谷胱甘肽检测步骤

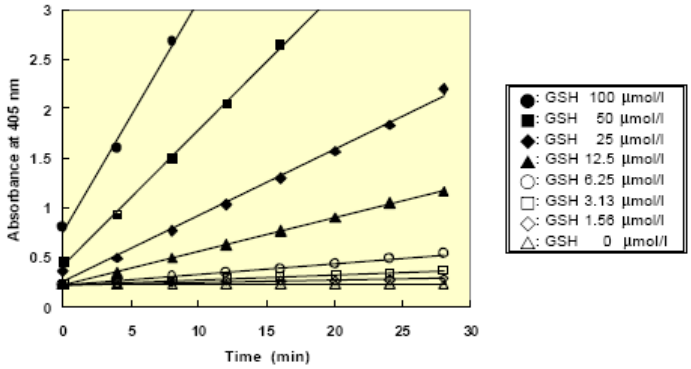


图 6：不同 GSH 浓度下的 DTNB 比色反应
（自添加 Substrate working solution 起记录反应时间）

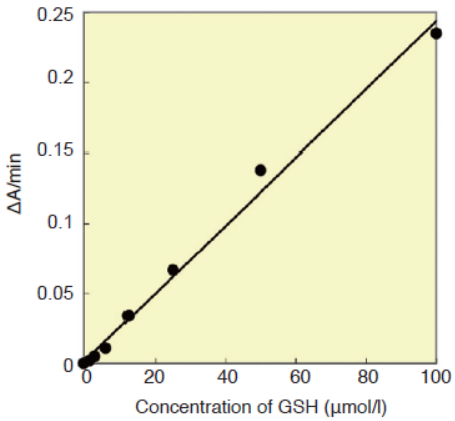


图 7：kinetic 法标准曲线

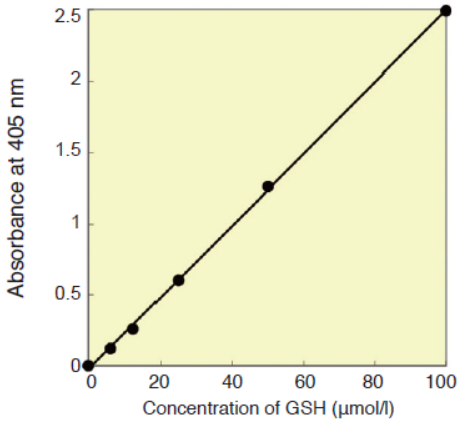


图 8：pseudo-endpoint 法标准曲线

总谷胱甘肽检测（高灵敏度）

检测范围：0.5-25 µM

1）向每孔中加入 20 µl Coenzyme working solution，120 µl Buffer solution 以及 20 µl Enzyme working solutions。

2）37℃下培养 5 分钟。

3）加入 20 µl GSH standard solution [a)] 或样品溶液[b)]。

a) 准备 50 µM GSH standard solutions，然后用 0.5% SSA 将其逐级稀释为如下浓度：

25 μM，12.5 μM，6.25 μM，3.13 μM，1.56 μM，0.78 μM，0.39 μM 和 0 。

b) 检测前先用ddH_2O调整样品溶液中SSA的浓度为 0.5%。高浓度的SSA（>1%）会引起溶液pH值的变化，对检测有所干扰。

4）37℃下培养 10 分钟。

5）加入 20 μl Substrate working solution，室温下培养 20-40 分钟。

6）用酶标仪在 405 nm 或 415 nm 下测定吸光度。

7）用标准曲线测定所得样品溶液的 GSH 浓度。

总谷胱甘肽浓度的计算使用以下公式[a)]

pseudo-end point 法：

总谷胱甘肽=（$O.D._{sample}$-$O.D._{blank}$）/ Slope

kinetic 法：

总谷胱甘肽=（Slope [c)] $_{sample}$- Slope [c)] $_{blank}$）/ Slope [b)]

[a)] 由于这个公式所得数值是处理后的样品中总谷胱甘肽的量，如果需要知道细胞或者组织中实际的谷胱甘肽的浓度，还需要作进一步的计算由 pseudo-endpoint 法或 kinetic 法所制备的标准曲线的斜率。

[b)] 标准曲线的斜率

[c)] kinetic反应的斜率

干扰物：

还原剂（如抗坏血酸，ß-mercaptoethanol，DTT，半胱氨酸）以及巯基活性化合物（如马来酰亚胺基）会对检测造成干扰。因此，在制备样品溶液的时候应该设法先将其除去。

参考文献：

1. G. L. Ellman, AArrcchh. *Biochem. Biophys.*, **1959**, *82*, 70.
2. O. W. Griffith, *Anal. Biochem.*, **1980**, *106*, 207.
3. M. E. Anderson, *Methods in Enzymol.*, **1985**, *113*, 548.
4. M. A. Baker, G. J. Cerniglia, and A. Zaman, *Anal. Biochem.*, **1990**, *190*, 360.
5. C. Vandeputte, I. Guizon, I. Genestie-Denis, B. Vannier and G. Lorenzon, *Cell Biol. Toxicol.*, **1994**, *10*, 415.

如果您需要更多的信息或者有任何问题可以通过下列方式联系我们：

上海	北京
上海市零陵路 899 号飞洲国际广场 27 楼 J 座	北京市朝阳区德外马甸裕民路 12 号元辰鑫大厦 E1-210 室
邮编：200030	邮编：100029
电话：800-988-0083	电话：010-8225-1765
网址：http://www.dojindo.cn	E-mail: info@dojindo.cn

修订：2011-10-30