

# 总谷胱甘肽-氧化型谷胱甘肽 (T-GSH/GSSG)

## 检测试剂盒

(货号: BC031 微板法)

### 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、试剂盒组成和配制:

	组份	48T	96T	保存
试剂一	底物一粉剂	粉剂×1 支	粉剂×2 支	4°C保存
	底物一缓冲液	5ml×1 瓶	5ml×2 瓶	4°C保存
试剂一应用液的配制: 临用前每支粉剂加入 5ml 的试剂一(底物一)缓冲液, 充分溶解后, 4°C避光保存				
试剂二	底物二贮备液	25µl×1 支	25µl×2 支	-20°C保存
	底物二稀释液	500µl×1 支	500µl×2 支	-20°C保存
试剂二应用液配制: 临用前按试剂二贮备液稀释液-119 的比例进行稀释, 现用现配, 需多少配多少。				
试剂三	粉剂	粉剂×3 支	粉剂×5 支	-20°C保存
	稀释液	1ml×3 支	1ml×5 支	4°C保存
试剂三的配制: 临用前每支粉剂加 1ml 试剂三稀释液, 充分溶解后使用, 现用现配, 需多少配多少。				
试剂四	粉剂	粉剂×3 瓶	粉剂×5 瓶	4°C保存
试剂四的配制: 临用前每瓶加煮沸的双蒸水至 10ml, 充分溶解冷却后作匀浆介质用, 余下 4°C保存 3 天。				
试剂五	贮备液	15ul×1 支	30µ×1 支	4°C保存
	试剂五溶剂	150µl×1 瓶	300µl×1 瓶	4°C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 的比例进行稀释, 充分溶解, 现用现配。				
试剂六	液体	250µl×1 支	500µl×1 支	4°C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 支	粉剂×1 支	4°C保存
1mmolL 的 GSSG 贮备液配制: 临用前加入 10ml 的双蒸水, 配成 1mmol/L 的 GSSG 贮备液, 分装后-20°C保存一个月有效。				
50pmolL 的 GSSG 标准品应用液配制: 将 1mmolL 的 GSSG 贮备液用试剂四 20 倍 (1: 19) 稀释制备成 50umol/L 的 GSSG 标准品应用液,				



现用现配。				
<b>GSH 标准品</b>	3.07mg	粉剂×1 支	粉剂×1 支	4°C保存
<b>1mmol/L 的 GSH 贮备液配制：</b> 临用前加入 10ml 的双蒸水，配成 1mmol/L 的 GSH 贮备液，分装后-20°C保存一个月有效。				
<b>50pmol/L 的 GSH 标准品应用液配制：</b> 将 1mmol/L 的 GSH 贮备液用试剂四 20 倍（1：19）稀释制备成 50umol/L 的 GSH 标准品应用液，现用现配。				

三、样本测试前处理：详见说明书末尾

四、操作过程：

1、T-GSH 的测定步骤

	标准管	测定管
50umol/LGSH 标准品 (μl)	10	
样本 (μl)		10
试剂一 (μl)	100	100
试剂二 (μl)	10	10
混匀后，室温（25°C）静置 2 分钟		
试剂三 (μl)	50	50

加试剂三的同时开始计时，轻轻摇动酶标板使试剂充分混匀，置酶标仪中，405nm 处，30 秒时准时读取吸光度值（A1），室温（25°C）静置 10 分钟，10 分 30 秒时准时读取吸光度值（A2）。

2、GSSG 的测定步骤：

①、前处理

试剂名称	标准管	测定管
50μmol/LGSSG 标准品 (μl)	100	
样本 (ul)		100
试剂五 (μl)	2	2
试剂六 (μl)	5	5

漩涡混匀 1 分钟，37°C 反应 30 分钟，然后取样 10μl 进行测定



②、GSSG 合金量测定：

试剂名称	标准管	测定管
标准前处理液 (μl)	10	
样本前处理液 (μl)		10
试剂一 (μl)	100	100
试剂二 (μl)	10	10
混匀后，室温 (25°C) 静置 2 分钟		
试剂三 (μl)	50	50

加试剂三的同时开始计时，轻轻摇动酶标板使试剂充分混匀，置酶标仪中，405nm 处，30 秒时准时读取吸光度值 (A1)，室温 (25°C) 静置 10 分钟，10 分 30 秒时准时读取吸光度值 (A2)。

五、计算公式：

$$T-GSH \text{ 含量 } (\mu\text{mol/L}) = \frac{T-GSH \text{ 测定 } \Delta A \text{ 值 } (A_2 - A_1)}{T-GSH \text{ 标准 } \Delta A \text{ 值 } (A_2 - A_1)} \times \frac{\text{标准品浓度}}{50 \mu\text{mol/L}} \times \frac{\text{样本测试前}}{\text{稀释倍数}}$$

$$GSSG \text{ 含量 } (\mu\text{mol/L}) = \frac{GSSG \text{ 测定 } \Delta A \text{ 值 } (A_2 - A_1)}{GSSG \text{ 标准 } \Delta A \text{ 值 } (A_2 - A_1)} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(50 \mu\text{mol/L})} \times \frac{\text{样本测试前}}{\text{稀释倍数}}$$

$$\text{还原型谷胱甘肽(GSH)含量} = T-GSH - 2 \times GSSG \text{ 含量}$$

注：

CGSH标准：T-GSH标准品浓度，50μmol/L；

CGSSG标准：GSSG标准品浓度，50μmol/L；

N：样本测试前稀释倍数。



## 附: 样本处理方法 :

1、**全血样本**: 取血, 用肝素或者EDTA抗凝。取100L抗凝的全血, 加入400mL的新配的试剂四 (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。

