

## CheKine™ 总谷胱甘肽 (T-GSH) / 氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 含量检测试剂盒 (微量法)

货号: KTB1671

规格: 48 T/ 24 S

96 T/48 S

批号: 见产品标签

|                                                                                   |                                                                   |                                                                                   |                         |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
|  | 检测范围: 0.78-50 $\mu\text{M}$ (T-GSH); 0.78-25 $\mu\text{M}$ (GSSG) |  | 灵敏度: 0.78 $\mu\text{M}$ |
|  | 适用样本: 动植物组织、全血、血细胞、细胞、细菌、血清 (浆)                                   |                                                                                   |                         |
|  | 保质期: -20 $^{\circ}\text{C}$ , 避光保存 12 个月                          |                                                                                   |                         |

### 01 背景与原理

总谷胱甘肽 (T-GSH) 包括还原型 (GSH) 和氧化型 (GSSG) 谷胱甘肽。GSSG 又称为二硫代谷胱甘肽, 由两分子的还原型谷胱甘肽氧化而成。谷胱甘肽能帮助保持正常的免疫系统功能, 并具有抗氧化作用、整合解毒作用。GSSG 会被谷胱甘肽还原酶还原成 GSH, 因此机体中大多数是以还原型形式存在。测定细胞内 GSH 和 GSSG 含量以及 GSH/GSSG 比值, 能够很好地反映细胞所处的氧化还原状态, 也是谷胱甘肽氧化还原循环的主要指标之一。

本试剂盒检测原理是利用谷胱甘肽还原酶 (Glutathione reductase, GR) 将 GSSG 还原为 GSH, GSH 与 5,5-二硫双 (2-硝基苯甲酸) (DTNB) 反应生成 2-硝基-5-巯基苯甲酸, 反应液呈黄色, 测定其在 412 nm 处的吸光度值的变化即可计算样本中总谷胱甘肽的含量。使用适当的封闭剂抑制样品中原有的还原型谷胱甘肽, 然后利用上述反应即可测定样本中 GSSG 的含量, 从总谷胱甘肽中减去氧化型谷胱甘肽的含量即可计算出样本中还原型谷胱甘肽的含量。

### 02 包装清单

| 试剂盒组分             | 规格               |                   | 储存要求                          |
|-------------------|------------------|-------------------|-------------------------------|
|                   | 48 T             | 96 T              |                               |
| Extraction Buffer | 70 mL            | 70 mL×2           | 4 $^{\circ}\text{C}$          |
| Inhibitor         | 50 $\mu\text{L}$ | 100 $\mu\text{L}$ | -20 $^{\circ}\text{C}$ , 避光保存 |
| Assay Buffer      | 12.5 mL          | 25 mL             | 4 $^{\circ}\text{C}$          |
| GR                | 25 $\mu\text{L}$ | 50 $\mu\text{L}$  | 4 $^{\circ}\text{C}$ , 避光保存   |
| GR Cofactor       | Powder×1 vial    | Powder×1 vial     | -20 $^{\circ}\text{C}$ , 避光保存 |
| Chromogen         | 1.5 mL           | 3 mL              | 4 $^{\circ}\text{C}$ , 避光保存   |
| GSH Standard      | Powder×1 vial    | Powder×1 vial     | 4 $^{\circ}\text{C}$ , 避光保存   |
| GSSG Standard     | Powder×1 vial    | Powder×1 vial     | 4 $^{\circ}\text{C}$ , 避光保存   |

\*请在实验前检查各组分的量。

\*各组分在规格基础上额外提供 10% 的量用于进行标准曲线制作或预实验。

03 自备仪器与试剂

| 自备资源类型 | 资源名称                                           | 备注                         |
|--------|------------------------------------------------|----------------------------|
| 仪器     | 酶标仪                                            | 能测 412 nm 处的吸光度（备选 405 nm） |
| 耗材     | 96 孔酶标板                                        | 普通透明板                      |
| 试剂     | PBS、去离子水                                       | 清洗样本用/配制试剂用                |
| 其他     | 匀浆器（组织样本）、水浴锅、超声破碎仪（细胞或细菌）、冰盒、低温离心机、可调节式移液枪及枪头 | 检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率  |

04 注意事项

- 正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 建议实验者自行建立标准曲线以提高结果准确度。如未自行建立标准曲线，可参考结果展示部分的典型标准曲线公式进行结果计算。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，请在实验全程做好生物安全防护，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

| 试剂名称              | 试剂准备                                       | 注意事项                                          |
|-------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Extraction Buffer | 即用型                                        | 实验过程中冰上放置；4℃保存                                |
| Inhibitor         | 即用型                                        | -20℃避光保存。Inhibitor 有毒且有刺激性气味，建议在通风橱进行实验       |
| Assay Buffer      | 即用型；使用前平衡到室温                               | 4℃保存                                          |
| GR                | 即用型；使用前需混匀                                 | 实验过程中冰上放置；4℃避光保存                              |
| GR Cofactor 工作液   | 临用前配制；48T 加 1.5 mL 去离子水或 96T 加 3 mL 去离子水溶解 | 实验过程中冰上放置；未用完的试剂分装后-20℃避光保存 1 个月，禁止反复冻融       |
| Chromogen         | 即用型；使用前避光平衡到室温                             | 4℃避光保存                                        |
| GSH 标准品           | 临用前配制；用 1 mL Assay Buffer 溶解               | 10 mM；实验过程中冰上放置；未用完的试剂分装后-20℃避光保存 1 个月，禁止反复冻融 |
| GSSG 标准品          | 临用前配制；用 1 mL Assay Buffer 溶解               | 10 mM；实验过程中冰上放置；未用完的试剂分装后-20℃避光保存 1 个月，禁止反复冻融 |

## 05-1-2 标准品配制

取 10  $\mu\text{L}$  10 mM GSH/GSSG 标准品用 990  $\mu\text{L}$  Extraction Buffer 稀释得 100  $\mu\text{M}$  GSH/GSSG 标准品，按照下表所示，进一步稀释标准品。每次实验都要做一次标准品检测，制作标曲；稀释后的标准品溶液不稳定，必须保持冰上放置，在 4 小时内使用。检测 T-GSH 时使用 0-50  $\mu\text{M}$  GSH 标准品浓度，检测 GSSG 时使用 0-25  $\mu\text{M}$  GSSG 标准品浓度。

| 序号 | Standard ( $\mu\text{L}$ )             | Extraction Buffer ( $\mu\text{L}$ ) | 浓度 ( $\mu\text{M}$ ) |
|----|----------------------------------------|-------------------------------------|----------------------|
| 1  | 100 $\mu\text{L}$ 100 $\mu\text{M}$    | 100                                 | 50                   |
| 2  | 100 $\mu\text{L}$ 50 $\mu\text{M}$     | 100                                 | 25                   |
| 3  | 100 $\mu\text{L}$ 25 $\mu\text{M}$     | 100                                 | 12.5                 |
| 4  | 100 $\mu\text{L}$ 12.5 $\mu\text{M}$   | 100                                 | 6.25                 |
| 5  | 100 $\mu\text{L}$ 6.25 $\mu\text{M}$   | 100                                 | 3.125                |
| 6  | 100 $\mu\text{L}$ 3.125 $\mu\text{M}$  | 100                                 | 1.5625               |
| 7  | 100 $\mu\text{L}$ 1.5625 $\mu\text{M}$ | 100                                 | 0.78125              |
| 空白 | 0                                      | 100                                 | 0                    |

## 05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 30 天。因 Extraction Buffer 中含有蛋白质沉淀剂，因此上清液不能直接用于蛋白浓度测定。如需测定蛋白含量，需另取相同样本，把 Extraction Buffer 换成去离子水提取制备。本试剂盒涉及氧化还原反应，具有还原或氧化特性的试剂比如 DTT、TCEP、 $\beta$ -巯基乙醇、铁离子、半胱氨酸等会干扰反应，另外 Tris 也会影响检测，因此在样本制备过程中应避免使用含有这些物质的试剂。推荐使用氧化锆研磨珠研磨样本，超声破碎前检查探头是否生锈。

- **动植物组织样本**：请尽量使用新鲜的组织样本进行测定。称取 0.1 g 组织样本，加入 1 mL 预冷的 Extraction Buffer，快速冰上匀浆（匀浆器提前放冰上预冷）。匀浆后的样本，4℃，8000 g 离心 10 min，取上清液置冰上待测。
- **血清（浆）样本**：请尽量使用新鲜的血清（浆）进行测定。取 60  $\mu\text{L}$  血清（浆），加入 3 倍体积的 Extraction Buffer，室温静置 5 min，4℃，8000 g 离心 10 min，取上清液置冰上待测。
- **细胞（菌）样本**：请尽量使用新鲜的细胞（菌）进行测定，而不要使用冻存的细胞（菌）进行测定。收集  $5 \times 10^6$  个细胞（菌），用 1 mL 预冷的 PBS 清洗细胞（菌）2 次（PBS 重悬，4℃，600 g 离心 10 min），加入 1 mL Extraction Buffer 重悬细胞（菌），冰浴超声波破碎 5 min（功率 20%或 200W，超声 3 s，间隔 7s，重复 30 次），4℃，8000 g 离心 10 min，取上清液置冰上待测。细胞也可以使用冻融法提取，重悬的细胞反复快速冻融 2-3 次（在液氮中冻结，37℃水浴中溶解），4℃，8000 g 离心 10 min，取上清液置冰上待测。
- **全血样本**：请尽量使用新鲜的全血样本进行测定。取 60  $\mu\text{L}$  全血样本，加入 3 倍体积的 Extraction Buffer，快速冰上匀浆（匀浆器提前放冰上预冷），匀浆后的样本，4℃，8000 g 离心 10 min，液体表层可能会出现一层“血膜”，为避免“血膜”干扰，取上清 4℃，8000 g 再离心 1 min，取上清液置冰上待测。
- **红细胞样本**：将抗凝管收集的血液 4℃，1000 g 离心 10 min。弃去上层血浆及白细胞层，用 5 倍体积预冷的 PBS 清洗红细胞 2 次，4℃，1000 g 离心 10 min，取 100  $\mu\text{L}$  红细胞加入 0.3 mL Extraction Buffer，快速冰上匀浆或者研磨、超声破碎，参考上述样本破碎方法，4℃，8000 g 离心 10 min，取上清液置冰上待测。

### 05-3 实验步骤

1. 酶标仪准备：预热 30 min 以上，调节波长到 412 nm。

2. **Inhibitor 工作液的配制**：临用前配制，现配现用。对于 96 孔板，每孔配制 160.5  $\mu\text{L}$  Inhibitor 工作液。吸取 0.5  $\mu\text{L}$  Inhibitor，160  $\mu\text{L}$  Assay Buffer，充分混匀。

**酶促工作液的配制**：临用前配制，现配现用。对于 96 孔板，每孔配制 22  $\mu\text{L}$  酶促工作液。吸取 0.4  $\mu\text{L}$  GR，1.6  $\mu\text{L}$  Assay Buffer，20  $\mu\text{L}$  GR Cofactor 工作液，充分混匀。**注意：GR 需混匀后再取用。**

**T-GSH 工作液的配制**：临用前配制，现配现用。对于 96 孔板，每孔配制 202  $\mu\text{L}$  T-GSH 工作液。吸取 160  $\mu\text{L}$  Assay Buffer，22  $\mu\text{L}$  酶促工作液，20  $\mu\text{L}$  Chromogen，充分混匀。**注意：T-GSH 工作液不稳定，配制后十分钟内使用。**

3. 检测 **GSSG 体系**配制：在 96 孔板中按照如下方式操作

| 试剂                                        | 空白孔 ( $\mu\text{L}$ ) | 标准孔 ( $\mu\text{L}$ ) | 测定孔 ( $\mu\text{L}$ ) |
|-------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 样本                                        | 0                     | 0                     | 20                    |
| GSSG 标准品                                  | 0                     | 20                    | 0                     |
| Extraction Buffer                         | 20                    | 0                     | 0                     |
| Inhibitor 工作液                             | 160                   | 160                   | 160                   |
| 混匀后 37℃避光孵育 30 min，然后依次加入酶促工作液和 Chromogen |                       |                       |                       |
| 酶促工作液                                     | 22                    | 22                    | 22                    |
| Chromogen                                 | 20                    | 20                    | 20                    |

**注意**：因反应迅速，建议单独做标准曲线，并从低浓度到高浓度的顺序向标准品中添加 **Chromogen**。检测样本时，在 5 min 内完成全部加样操作不会影响检测结果。

4. 吸光度检测：充分混匀后立即在 412 nm 处读取吸光度值  $A_1$ ，分别标记为  $A_{1\text{空白}}$ 、 $A_{1\text{标准}}$  和  $A_{1\text{测定}}$ ，室温 (25℃) 避光孵育 5 min 后，立即在 412 nm 处读取吸光度值  $A_2$ ，分别标记为  $A_{2\text{空白}}$ 、 $A_{2\text{标准}}$  和  $A_{2\text{测定}}$ 。

5. 检测 **T-GSH 体系**配制：在 96 孔板中按照如下方式操作

| 试剂                | 空白孔 ( $\mu\text{L}$ ) | 标准孔 ( $\mu\text{L}$ ) | 测定孔 ( $\mu\text{L}$ ) |
|-------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 样本                | 0                     | 0                     | 20                    |
| GSH 标准品           | 0                     | 20                    | 0                     |
| Extraction Buffer | 20                    | 0                     | 0                     |
| T-GSH 工作液         | 200                   | 200                   | 200                   |

**注意**：因反应迅速，建议单独做标准曲线，并从低浓度到高浓度的顺序向标准品中添加 **T-GSH 工作液**。检测样本时，在 5 min 内完成全部加样操作不会影响检测结果。检测量大时，建议使用多通道移液器操作以提高加样速度。

6. 吸光度检测：充分混匀后立即在 412 nm 处读取吸光度值  $A_1$ ，分别标记为  $A_{1\text{空白}}$ 、 $A_{1\text{标准}}$  和  $A_{1\text{测定}}$ ，室温 (25℃) 避光孵育 5 min 后，立即在 412 nm 处读取吸光度值  $A_2$ ，分别标记为  $A_{2\text{空白}}$ 、 $A_{2\text{标准}}$  和  $A_{2\text{测定}}$ 。

## 06 结果计算

### 06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn)进入“技术中心”查找“在线计算器”工具。



### 06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

#### 1. 数据处理

计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ ， $\Delta\Delta A_{\text{标准}} = \Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}$ ， $\Delta\Delta A_{\text{测定}} = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}$ 。

#### 2. 标准曲线绘制

以标准品浓度为 y 轴， $\Delta\Delta A_{\text{标准}}$  为 x 轴，绘制标准曲线。将 $\Delta\Delta A_{\text{测定}}$ 代入方程得到 y 值（ $\mu\text{M}$ ）。

#### 3. 样本 GSSG 计算

##### ● 按样本质量计算

$$\text{GSSG}(\text{nmol/g}) = y \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \times n = y \div W \times n$$

##### ● 按细胞或细菌数量计算：

$$\text{GSSG}(\text{nmol}/10^4) = y \times V_{\text{样}} \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \times n = y \div N \times n$$

##### ● 按液体体积计算

$$\text{GSSG}(\text{nmol/mL}) = y \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_2 \times V_1) \times n = 4y \times n$$

##### ● 按蛋白浓度数量计算

$$\text{GSSG}(\text{nmol/mg prot}) = y \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \times n = y \div \text{Cpr} \times n$$

#### 4. 样本 T-GSH 计算

##### ● 按样本质量计算

$$\text{T-GSH}(\text{nmol/g}) = y \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \times n = y \div W \times n$$

##### ● 按细胞或细菌数量计算：

$$\text{T-GSH}(\text{nmol}/10^4) = y \times V_{\text{样}} \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \times n = y \div N \times n$$

##### ● 按液体体积计算

$$\text{T-GSH}(\text{nmol/mL}) = y \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_2 \times V_1) \times n = 4y \times n$$

##### ● 按蛋白浓度数量计算

$$\text{T-GSH}(\text{nmol/mg prot}) = y \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \times n = y \div \text{Cpr} \times n$$

#### 5. 样本 GSH 计算

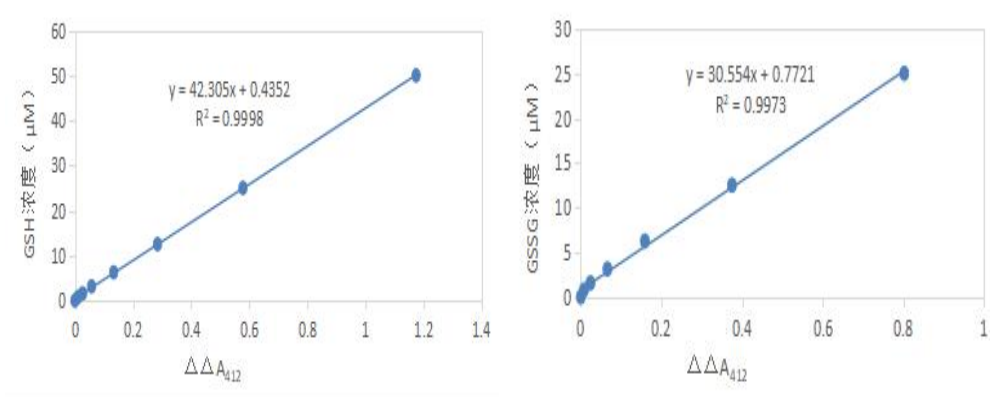
$$\text{GSH} = \text{T-GSH} - \text{GSSG} \times 2$$

nmol:  $1 \mu\text{M} = 1 \text{ nmol/mL}$ ;  $V_{\text{样}}$ : 加入样本体积,  $20 \mu\text{L}$ ;  $V_{\text{提取}}$ : 加入 Extraction Buffer 体积,  $1 \text{ mL}$ ;  $V_1$ : 提取时加入的液体样本体积;  $V_2$ : 液体样本提取时的总体积 (加入的提取液体积为  $3V_1$ ,  $V_2 = 4V_1$ );  $W$ : 样本质量, g;  $n$ : 样本稀释倍数;  $\text{Cpr}$ : 样本蛋白质浓度,  $\text{mg/mL}$ ;  $N$ : 细胞或细菌数量, 以  $10^4$  为单位 (例如细胞数量为  $5 \times 10^6$ ,  $N=500$ ); 1 分子氧化型谷胱甘肽可被还原为 2 分子还原型谷胱甘肽。

07 结果展示

典型标准曲线：

T-GSH:  $y=42.305x+0.4352$ ,  $R^2=0.9998$ ; GSSG:  $y=30.554x+0.7721$ ,  $R^2=0.9973$ 。



示例-1: 取 0.1 g 兔脑组织, 检测 T-GSH 时稀释 5 倍 ( $n_{T-GSH}=5$ ), 检测 GSSG 不稀释 ( $n_{GSSG}=1$ ), 按照测定步骤操作, 用 96 孔板进行检测。分别测得:  $\Delta A_{T-GSH \text{ 测定}}=A_{2 \text{ 测定}}-A_{1 \text{ 测定}}=0.5503-0.1640=0.3863$ ,  $\Delta A_{T-GSH \text{ 空白}}=A_{2 \text{ 空白}}-A_{1 \text{ 空白}}=0.0823-0.0793=0.0030$ ,  $\Delta\Delta A_{T-GSH \text{ 测定}}=\Delta A_{\text{测定}}-\Delta A_{\text{空白}}=0.3863-0.0030=0.3833$ ;  $\Delta A_{GSSG \text{ 测定}}=A_{2 \text{ 测定}}-A_{1 \text{ 测定}}=0.2510-0.1067=0.1443$ ,  $\Delta A_{GSSG \text{ 空白}}=A_{2 \text{ 空白}}-A_{1 \text{ 空白}}=0.0877-0.0863=0.0013$ ,  $\Delta\Delta A_{GSSG \text{ 测定}}=\Delta A_{\text{测定}}-\Delta A_{\text{空白}}=0.1443-0.0013=0.1430$ 。

将 $\Delta\Delta A_{T-GSH \text{ 测定}}$ 和 $\Delta\Delta A_{GSSG \text{ 测定}}$ 分别代入标准曲线方程, 得到  $y_{T-GSH}=16.652$  和  $y_{GSSG}=5.141$ 。按样本质量计算得:  $T-GSH(\text{nmol/g})=y_{T-GSH}\div W\times n_{T-GSH}=832.6 \text{ nmol/g}$ ,  $GSSG(\text{nmol/g})=y_{GSSG}\div W\times n_{GSSG}=51.41 \text{ nmol/g}$ ,  $GSH=T-GSH-GSSG\times 2=729.78 \text{ nmol/g}$ 。

08 FAQ

- 检测得到的样本 $\Delta\Delta A_{\text{测定}}$ 过高或者过低怎么办?  
如果样本的 $\Delta\Delta A_{\text{测定}}$ 大于标准品最高浓度的 $\Delta\Delta A_{\text{标准}}$ , 则说明样本 T-GSH/GSSG 含量太高, 需用提取液适当稀释 (计算公式中乘以相应稀释倍数); 如果样本的 $\Delta\Delta A_{\text{测定}}$ 小于标准品最低浓度的 $\Delta\Delta A_{\text{标准}}$ , 可提高样本量或者减少提取液体积。

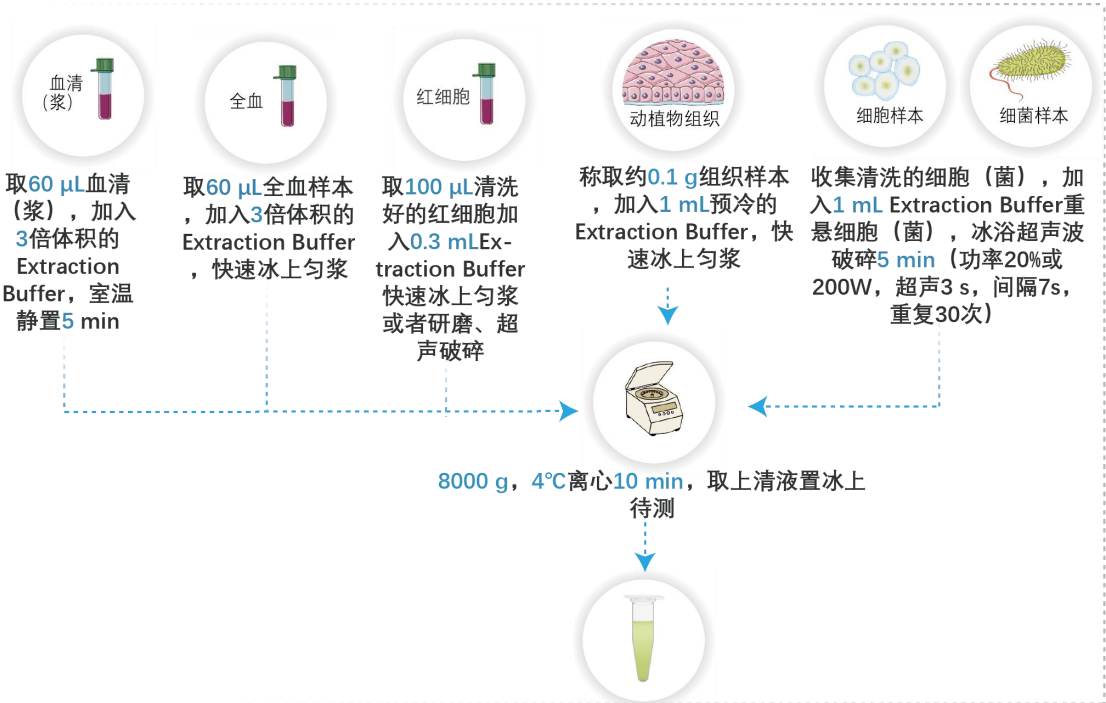
09 相关产品

| 货号      | 试剂盒名称                                     |
|---------|-------------------------------------------|
| KTB1620 | CheKine™ 谷胱甘肽还原酶 (GR) 活性检测试剂盒 (微量法)       |
| KTB1630 | CheKine™ 谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 检测试剂盒 (微量法)     |
| KTB1640 | CheKine™ 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性检测试剂盒 (微量法) |

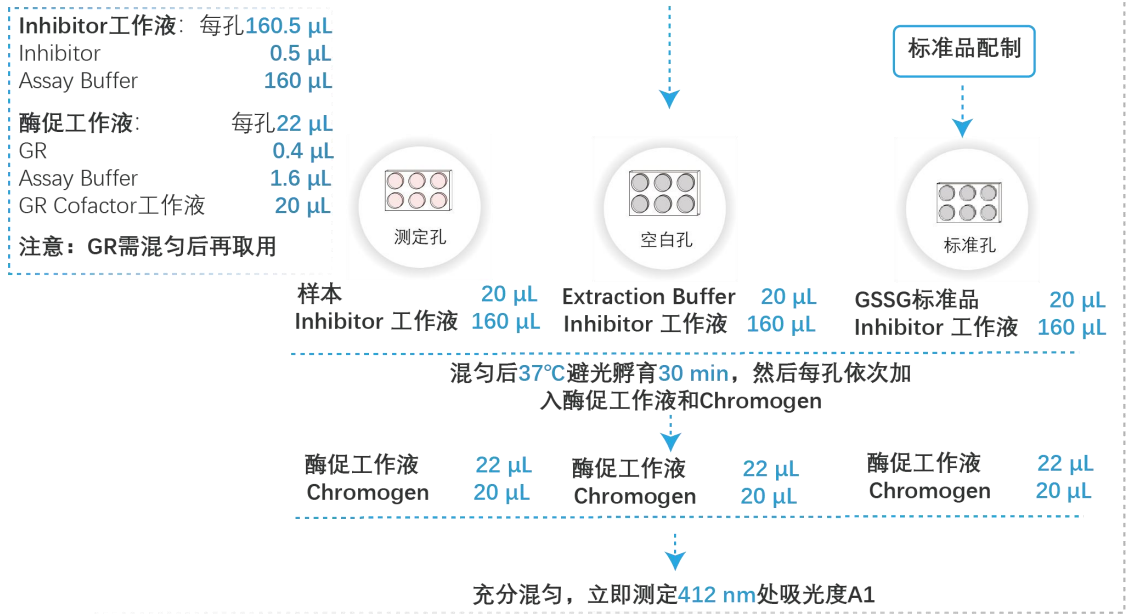
# CheKine™ 氧化型谷胱甘肽（GSSG）含量检测流程示意图

(Abbkinne 货号：KTB1671)

样本处理



体系配置



数据检测

室温 (25°C) 避光孵育5 min后, 测定412 nm处吸光度A2  
结果计算

# CheKine™ 总谷胱甘肽 (T-GSH)含量检测流程示意图

(Abbkin 货号：KTB1671)

