

GSH/GSSG Ratio Fluorimetric Detection Assay Kit

(Green Fluorescence)

GSH/GSSG 比例荧光检测试剂盒（绿色荧光）

产品信息

产品名称	产品编号	规格
GSH/GSSG Ratio Fluorimetric Detection Assay Kit (Green Fluorescence)	50120ES70	200 T
GSH/GSSG 比例荧光检测试剂盒（绿色荧光）		

产品描述

谷胱甘肽(Glutathione)是一种由3个氨基酸残基（甘氨酸、谷氨酸和半胱氨酸）组成的小肽，保护细胞免受活性氧引起的细胞损伤。谷胱甘肽在细胞中主要以还原性谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)和氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione disulfide, GSSG)两种形式存在。

GSH是细胞中重要的抗氧化剂，能维持蛋白的还原状态。在谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)催化的反应中，两个GSH分子通过巯基脱氢形成二硫键而产生GSSG。此外，谷胱甘肽还原酶(GR)氧化 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(β -NADPH₂)的同时会将GSSG转变为GSH。在正常细胞中，GSH的含量超过谷胱甘肽总量的90%；当细胞中氧化应激水平上升时，GSSG含量增加，GSH/GSSG比例下降，所以，GSH/GSSG比例可做为细胞中氧化应激水平的指标。

该试剂盒采用了一种特殊的非荧光染料，通过与GSH反应发出强烈荧光(Ex/Em=490/520 nm)，可定量分析样品中的GSH含量；也可通过GSSG Probe将GSSG还原成GSH，定量分析样品中的GSSG含量。该试剂盒灵敏度高，可以在100 μ L测定体积中检测到至少1 pM的GSH或GSSG。

产品组分

组分编号	组分名称	组分规格	储存条件
50120-A	Thiolite Green	1 vial	-20°C
50120-B	Assay Buffer	25 mL×1	-20°C
50120-C	GSH Standard	1 vial (62 μ g)	-20°C
50120-D	DMSO	400 μ L×1	-20°C
50120-E	GSSG Probe	1 vial	-20°C
50120-F	GSSG Standard	1 vial (124 μ g)	-20°C

运输和保存方法

冰袋运输。避光保存于-20°C，有效期1年。

注意事项

- 1 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
- 2 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 3 粉末溶解前请先短暂离心，以保证产品全在管底。
- 4 请勿吸入、吞咽或者直接接触皮肤和眼睛。
- 5 本产品仅用于科研用途。

实验过程

1 试剂准备

- ① **GSH 标准品母液(1 mM)**: 将 200 μ L Assay Buffer (B 组分) 加入 GSH Standard (C 组分) 中制备 1 mM GSH 标准品母液, 用时置于冰上, 未用完的分装-20 $^{\circ}$ C 保存, 避免反复冻融。
- ② **GSSG 标准品母液(1 mM)**: 将 200 μ L ddH₂O 加入 GSSG Standard (F 组分) 中制备 1 mM GSSG 标准品母液, 用时置于冰上, 未用完的分装-20 $^{\circ}$ C 保存, 避免反复冻融。
- ③ **Thiolite Green 母液(100 \times)**: 将 100 μ L DMSO(D 组分) 逐滴加入 Thiolite Green(A 组分) 中, 涡旋振荡混匀, 制备 100 \times Thiolite Green 母液, 用时置于冰上, 未用完的分装-20 $^{\circ}$ C 避光保存, 避免反复冻融。
【注】: 为充分溶解也可用 200 μ L DMSO 配置成 50 \times Thiolite Green 母液。
- ④ **GSH 工作液**: 向 100 μ L Thiolite Green 母液(100 \times) 中加入 10 mL Assay Buffer (B 组分), 混匀。
【注】: 相当于两个 96 孔板的检测用量, 请根据实际情况进行调整。GSH 工作液在室温下不稳定, 注意避光, 并在配置后 2 h 以内使用。
- ⑤ **Total GSH 工作液**: 将 5 mL 的 GSH 工作液加入到 GSSG Probe (E 组分), 涡旋振荡混匀。
【注】: 相当于 1 个 96 孔板的检测用量, 请根据实际情况进行调整。Total Glutathione 工作液在室温下不稳定, 注意避光, 并在配置后 2 h 以内使用

2 GSH 和 GSSG 标准液准备

- 2.1 向 10 μ L 的 GSH 标准母液(1 mM) 中加入 990 μ L 的 Assay Buffer (B 组分) 配置 10 μ M GSH 标准液; 然后用 Assay Buffer (B 组分) 按 1: 1 比例依次稀释 200 μ L 的 10 μ M GSH 标准液以制备 5 μ M、2.5 μ M、1.25 μ M、0.625 μ M、0.3125 μ M 和 0.1563 μ M 的 GSH 标准液。
- 2.2 向 10 μ L 的 GSSG 标准母液(1 mM) 中加入 990 μ L 的 Assay Buffer(B 组分) 配置 10 μ M GSSG 标准液; 然后用 Assay Buffer (B 组分) 按 1: 1 比例依次稀释 200 μ L 的 10 μ M GSSG 标准液以制备 5 μ M、2.5 μ M、1.25 μ M、0.625 μ M、0.3125 μ M、0.1563 μ M 和 0.0781 μ M 的 GSSG 标准液。
【注】: 稀释的 GSH 和 GSSG 标准液不稳定, 需要在配置后 4 h 以内使用。

3 样本制备

- 3.1 细胞样本: 尽量使用新鲜样本。收集 10⁴-10⁵ 个细胞, 预冷 PBS 润洗后, 加入 100 μ L 裂解液(0.5% NP-40 in PBS, pH4-6), 冰上裂解, 12,000g 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min 取上清, 去蛋白处理 (见 3.4) 后用于检测。
- 3.2 组织样本: 取 20 mg 组织样本, 预冷 PBS 润洗后, 加入 400 μ L 裂解液(0.5% NP-40 in PBS, pH4-6), 冰上匀浆, 12,000g 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min 取上清, 去蛋白处理 (见 3.4) 后用于检测。
- 3.3 血浆、血清、血液和尿液样本: 使用新鲜样本, 去蛋白处理 (见 3.4) 后, 用于 GSH/GSSG 的测定。
- 3.4 去蛋白处理: 组织、细胞和生物液体中可能存在干扰检测的蛋白酶类, 可使用 TCA/NaHCO₃ 方法来去除蛋白。向样本中加入 5 倍体积预冷的 100% TCA, 混匀后冰上孵育 5-10 min, 12,000g 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min 取上清, 然后逐滴加入 NaHCO₃ 溶液中和至 pH 为 4-6, 取 1 μ L 样品用 pH 试纸进行测定; 然后, 13,000g 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min 取上清用于 GSH/GSSG 的测定。
【注】: 避免中和后的溶液 pH 超过 7, 因为 GSH 不稳定, 在 pH>7 时容易被氧化。

4 检测 GSH 和 Total GSH 含量

- 4.1 向黑色平底孔板中加入相应体积的标准液、待测样本和空白对照 (使用 Assay buffer, 组分 B), 见 Table1; 对于 96 孔板, 每孔加入 50 μ L 标准液或待测样本, 总测定体积为 100 μ L/孔; 对于 384 孔板, 每孔加入 25 μ L 标准液或待测样本, 总测定体积为 50 μ L/孔。

Table 1. Layout of GSH standards, GSSG standards, Blank Control and test samples in a solid black 96-well microplate.

Panel A: For GSH				Panel B: For Total GSH			
BL	BL	TS	TS	BL	BL	TS	TS
GSH1	GSH1	GSSG1	GSSG1
GSH2	GSH2	GSSG2	GSSG2
GSH3	GSH3			GSSG3	GSSG3		
GSH4	GSH4			GSSG4	GSSG4		
GSH5	GSH5			GSSG5	GSSG5		
GSH6	GSH6			GSSG6	GSSG6		
GSH7	GSH7			GSSG7	GSSG7		

GSH = GSH Standard (GSH1 - GSH7, 0.1563 to 10 μM), GSSG = GSSG Standard (GSSG1 - GSSG7, 0.0781 to 5 μM), BL = Blank Control, TS = Test Sample

4.2 对于测定 GSH 含量(Panel A), 向 GSH 标准液、待测样本和空白对照中加入同等体积 GSH 工作液。

4.3 对于测定 Total GSH 含量(Panel B), 向 GSSG 标准液、待测样本和空白对照中加入等体积 Total GSH 工作液。

4.4 混匀后, 室温孵育 10-60 min。

4.5 荧光酶标仪下测量荧光读值, Ex/Em = 490/520 nm。

【注】: 如果样本荧光过高, 注意稀释样本后再进行检测。

数据分析

1 从空白标准孔获得的读数用作阴性对照。从其他标准的读数中减去该值, 以获得基线校正值, 荧光背景会随时间而增加, 因此标准品和测试样本的荧光读值计算前需减去空白孔的荧光强度值。然后, 绘制标准读数以获得标准曲线和方程。该方程可以用于计算样本中 GSH 和 Total GSH 含量。

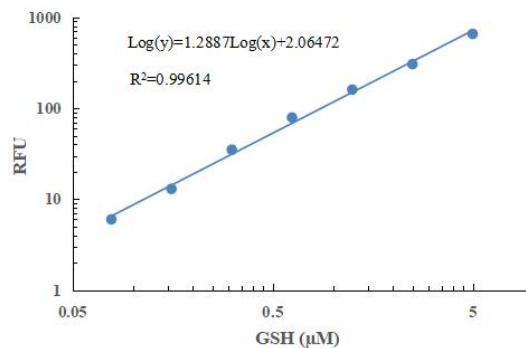


图 1 GSH 标准曲线

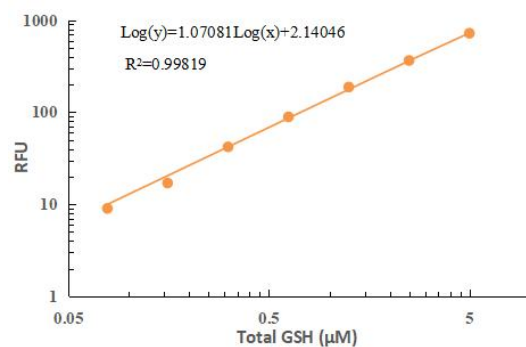


图 2 Total GSH 标准曲线 (横坐标为 GSSG 标准液浓度(0.0781-2.5 μM)换算成相应 GSH 浓度)

2 通过 Panel A GSH 的标准曲线计算样本中 GSH 的含量, 注意样本制备过程中的稀释倍数。

3 通过 Panel B GSSG 的标准曲线计算样本中 Total GSH 的含量, 注意样本制备过程中的稀释倍数。

4 由于 1 mole 的 GSSG 能转化成 2 mole 的 GSH, $\text{GSSG} = (\text{Total GSH} - \text{GSH})/2$ 。

