

概述

谷胱甘肽 (γ -L-谷氨酰-L-半胱氨酰-甘氨酸) 是体内的一种三肽化合物, 它参与抗氧化和药物代谢的过程, 还是谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽S-转移酶、巯基转移酶等的底物。谷胱甘肽通常以还原型状态 (GSH) 存在, 但是GSH在氧化应激的作用下会转化为氧化型状态 (GSSG)。因此GSH/GSSG的比值被认为是氧化应激研究的一个重要指标。

GSSG/GSH Quantification Kit含有GSH掩蔽剂, 加入掩蔽剂可以除去样品溶液中的GSH。因此可以通过检测加入DTNB (5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)) 后在412nm处的显色反应加上在谷胱甘肽还原酶作用下的循环体系选择性地对GSSG进行定量。GSH含量则可以通过总谷胱甘肽含量减去GSSG含量来得到。本试剂盒总谷胱甘肽和GSSG的检测限分别为0.5 $\mu\text{mol/l}$ - 50 $\mu\text{mol/l}$ 和0.5 $\mu\text{mol/l}$ - 25 $\mu\text{mol/l}$ 。

原理

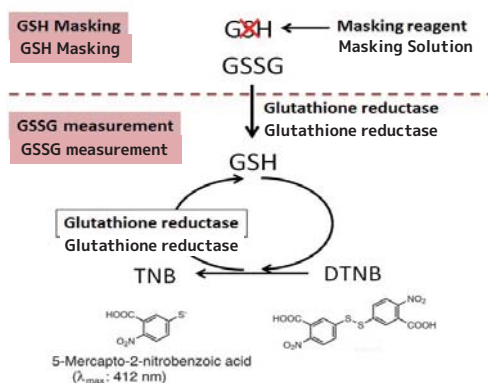


图1. GSSG/GSH检测原理

试剂盒内含

	100T
- Enzyme Solution	50 μl \times 1管
- Coenzyme	\times 1管
- Buffer Solution	60 ml \times 1瓶
- Substrate (DTNB)	\times 2管
- Standard GSH	\times 1管
- Standard GSSG	\times 1管
- Masking Solution	1 ml \times 1管

储存条件

0-5 $^{\circ}\text{C}$, 请先将本试剂盒恢复至室温后再使用。

所需的设备和材料

- 酶标仪 (405或415 nm)
- 20 μl 和200 μl 移液器, 多通道移液器
- 96孔板
- 培养箱
- 15 ml锥形管
- 5-磺基水杨酸 (SSA) 溶液
- 乙醇

注意事项

- * 请先将本试剂盒恢复至室温后再使用;
- * 建议每组样品设定3个复孔, 以便得到更准确的数据;
- * 由于加入Enzyme/Coenzyme 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;
- * 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;
- * 试剂盒中有带铅盖的玻璃管, 请小心拿取。

样品制备

组织 (100 mg)

- 1) 在0.5-1.0 ml 5%的SSA溶液中对组织匀浆。
- 2) 匀浆后的组织样品在8,000 $\times g$, 离心10 min。
- 3) 转移上清液至一支新管中, 用ddH₂O稀释, 将SSA浓度调节为0.5%。^{a)}

反应溶液的制备

细胞 (1×10^7 个细胞)

- 1) 在4 °C, $200 \times g$ 离心10 min后收集细胞, 弃上清。
- 2) 用300 μ l PBS清洗细胞, 在4 °C, $200 \times g$ 离心10 min, 弃上清。
- 3) 加入80 μ l 10 mM HCl, 反复冻融2次使细胞裂解。
- 4) 加入20 μ l 5%的SSA, 在 $8,000 \times g$ 离心10 min。
- 5) 转移上清液至一支新管中, 用ddH₂O稀释, 将SSA浓度调节为0.5%。^{a)}

血浆

- 1) 在4 °C, $1,000 \times g$ 离心抗凝处理的血液10 min。
- 2) 将最上层血浆转移至一支新管中, 加入血浆量的1/2体积的5%的SSA。
- 3) 在4 °C, $8,000 \times g$ 离心10 min。
- 4) 转移上清液至一支新管中, 用ddH₂O稀释, 将SSA浓度调节为0.5%。^{a)}

红血球^{b)}

- 1) 在4 °C, $1,000 \times g$ 离心抗凝处理的血液10 min。
- 2) 弃上清液及白膜层。
- 3) 用4倍体积的5% SSA溶解红血球。
- 4) 在4 °C, $8,000 \times g$ 离心10 min。
- 5) 转移上清液至一支新管中, 用ddH₂O稀释, 将SSA浓度调节为0.5%。^{a)}

a) 在使用样品溶液前, 请先用ddH₂O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

— Substrate Working Solution

- 1) 加1.2 ml Buffer Solution至Substrate (DTNB)管中, 溶解DTNB。
* 请确认是否完全溶解DTNB。如溶解不完全时, 请用超声或涡旋振荡。
* 如需保存, 则不要继续步骤2)。直接放在-20 °C保存, 可以保存2个月。
- 2) 转移上述全部溶液至15 ml锥形管中, 并用2.4 ml Buffer Solution稀释 (总体积为3.6 ml)。
* 一个96孔板需要使用2管Substrate (总体积: 7.2 ml)。
* 由于Substrate Working Solution不稳定, 所以需要现配现用。

— Enzyme/Coenzyme Working Solution

- 1) 用移液器吹打混匀Enzyme Solution, 吸取20 μ l至15 ml锥形管中, 用4 ml Buffer Solution稀释。
* Enzyme Solution可能会附着在管的内壁和盖子上, 开瓶前可轻摇晃下, 但是不可使用旋涡震荡器。
* 如需保存, 则不要继续步骤2)。直接放在0-5 °C保存, 可以保存2个月。
- 2) 取2.4 ml上述溶液至一支新的15 ml锥形管中。
- 3) 加2.4 ml ddH₂O至Coenzyme管中并溶解。
* 由于Coenzyme管做过减压处理, 请用注射器加入ddH₂O后再打开。
* 如需保存, 则不要继续步骤4), 将上述溶液放在-20 °C保存, 可以保存2个月。
- 4) 转移上述全部溶液至步骤2)的15 ml锥形管中, 并用2.4 ml Buffer Solution稀释 (总体积: 7.2 ml)。
* 由于Enzyme/Coenzyme Working Solution不稳定, 需要现配现用。

— 200 μ mol/l GSH Standard Solution

- 加2.0 ml 0.5%的SSA至Standard GSH管中并溶解。
- * 由于Standard GSH管做过减压处理, 请用注射器加入SSA后再打开。
 - * 将GSH Standard Solution溶液放在-20 °C保存, 可以保存2个月。

— 100 μ mol/l GSSG Standard Solution

- 加2.0 ml 0.5%的SSA至Standard GSSG管中并溶解。
- * 由于Standard GSSG管做过减压处理, 请用注射器加入SSA后再打开。
 - * 将GSSG Standard Solution溶液放在-20 °C保存, 可以保存2个月。

操作步骤

1. 样品制备

1) 如需要测定GSH和GSSG, 请准备2组样品溶液 (200 μl \times 2)。

- 测定 GSSG :

加200 μl 的样品, 20 μl 的Masking Solution至一个微管中, 用涡漩振荡器混匀, 作为 (GSSG) 样品管。

- 测量总谷胱甘肽 :

取200 μl 样品加入管中, 加入20 μl ddH₂O, 用涡漩振荡器混匀。

***如果样品溶液中总谷胱甘肽的浓度范围未知, 可梯度稀释样品溶液。**

2. GSSG Standard Solution的制备

1) 分别取100 μl 的100 $\mu\text{mol/l}$ GSSG Standard Solution和300 μl 0.5% SSA溶液至微管中, 混合制备终浓度为25 $\mu\text{mol/l}$ 的GSSG Standard Solution。用0.5% SSA溶液按图2中步骤进行梯度稀释以制备成下列GSSG Standard Solution, 浓度依次为: 25.0, 12.5, 6.25, 3.13, 1.57, 0.78和0 $\mu\text{mol/l}$ 。

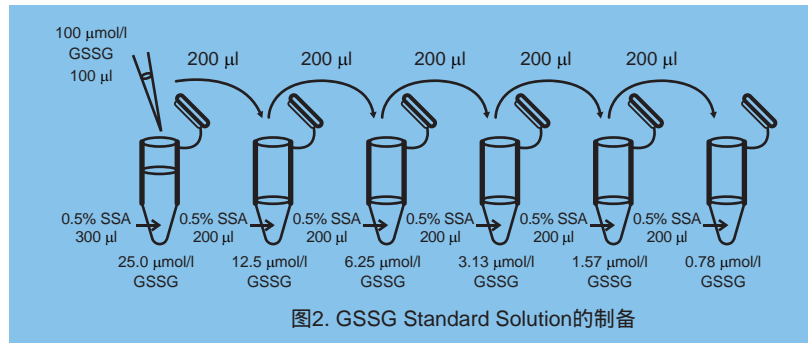
2) 在上述GSSG Standard Solution中加入20 μl Masking Solution, 用涡漩振荡器混匀。

3. GSH Standard Solution的制备

1) 分别取100 μl 浓度为200 $\mu\text{mol/l}$ 的GSH Standard Solution和300 μl 0.5%的SSA溶液至微管中, 混合制备终浓度为50 $\mu\text{mol/l}$ GSH Standard Solution。

用0.5% SSA溶液进行梯度稀释以制备成下列GSH Standard Solution, 浓度依次为: 50.0, 25.0, 12.5, 6.25, 3.13, 1.57和0 $\mu\text{mol/l}$ 。

2) 在配制好的200 μl GSH Standard Solution中加入20 μl ddH₂O, 用涡漩振荡器混匀。



4. 检测

1) 每孔加入40 μl GSSG Standard Solution, GSH Standard Solution, GSSG样品或GSH样品。

*** 建议每个样品重复3次, 以获得准确的数据。**

2) 每孔加入60 μl Buffer Solution。

3) 在37 $^{\circ}\text{C}$ 培养1 h。

*** 培养时盖上盖子以防止溶液在培养过程中蒸发。**

4) 每孔加入60 μl Substrate Working Solution。

5) 每孔加入60 μl Enzyme/Coenzyme Working Solution。

*** 加入Enzyme/ Coenzyme Working Solution后, 反应立即开始。建议用多通道移液器操作以减少各孔间误差。**

6) 在37 $^{\circ}\text{C}$ 培养10 min。

*** 如果选择Kinetics法, 请选择“Kinetic”模式。**

*** 在反应开始后的10 min, OD值呈线性增长, 因此可以采用Kinetic法或Pseudo-Endpoint法测定谷胱甘肽浓度(测定5-10 min内的某个时间点的OD值, 不需要终止反应)**

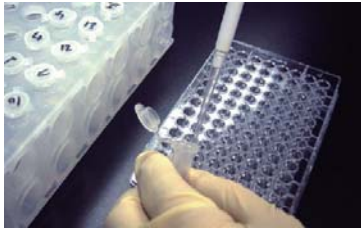
7) 用酶标仪在405 nm或415 nm下测定吸光度。

8) 用GSSG标准曲线测定所得GSSG样品溶液中的GSSG浓度。

9) 用GSH标准曲线测定所得GSH样品溶液中总谷胱甘肽 (GSH + GSSG) 的浓度。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0 $\mu\text{mol/l}$ GSSG	Sample 2 (GSSG)	0 $\mu\text{mol/l}$ GSH	Sample 2 (GSH)								
B	0.78 $\mu\text{mol/l}$ GSSG	Sample 3 (GSSG)	1.57 $\mu\text{mol/l}$ GSH	Sample 3 (GSH)								
C	1.57 $\mu\text{mol/l}$ GSSG	Sample 4 (GSSG)	3.13 $\mu\text{mol/l}$ GSH	Sample 4 (GSH)								
D	3.13 $\mu\text{mol/l}$ GSSG	Sample 5 (GSSG)	6.25 $\mu\text{mol/l}$ GSH	Sample 5 (GSH)								
E	6.25 $\mu\text{mol/l}$ GSSG	Sample 6 (GSSG)	12.5 $\mu\text{mol/l}$ GSH	Sample 6 (GSH)								
F	12.5 $\mu\text{mol/l}$ GSSG	Sample 7 (GSSG)	25.0 $\mu\text{mol/l}$ GSH	Sample 7 (GSH)								
G	25.0 $\mu\text{mol/l}$ GSSG	Sample 8 (GSSG)	50.0 $\mu\text{mol/l}$ GSH	Sample 8 (GSH)								
H	Sample 1 (GSSG)	Sample 9 (GSSG)	Sample 1 (GSH)	Sample 9 (GSH)								

图3. 96孔板排列示意图 (复孔n = 3)



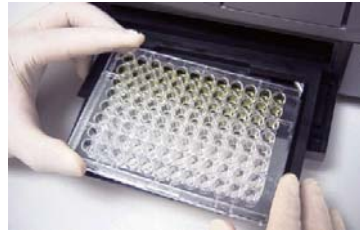
1) 每孔加入40 μl GSSG Standard Solution, GSH Standard Solution, GSSG样品或GSH样品。



3) 在37 °C 培养1 h。



4)-5) 每孔加入60 μl Substrate Working Solution和60 μl Enzyme/Coenzyme Working Solution。



7) 用酶标仪在405 nm或415 nm测定吸光度。

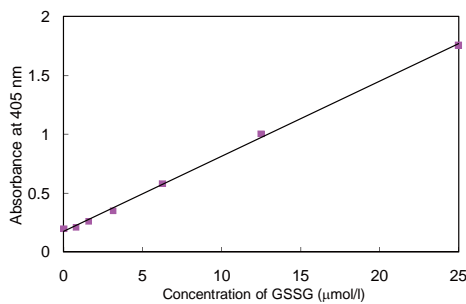


图4. GSSG的标准曲线

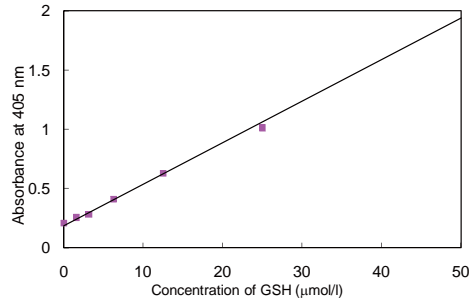


图5. GSH 的标准曲线

谷胱甘肽浓度可以采用Kinetic法或Pseudo-Endpoint 法测定

$$\text{Pseudo-Endpoint 法: Glutathione (GSH, GSSG)} = (\text{O.D.}_{\text{sample}} - \text{O.D.}_{\text{blank}}^{\text{a}}) / \text{slope}^{\text{b}}$$

$$\text{Kinetic法: Glutathione (GSH, GSSG)} = (\text{Slope}_{\text{sample}}^{\text{c}} - \text{Slope}_{\text{blank}}^{\text{a, c}}) / \text{slope}^{\text{b}}$$

a) 采用图3中的A1 - A3孔或A7 - A9孔的O.D.值。

b) Slope为标准品采用Kinetic法或Pseudo-Endpoint 法测定得到的曲线斜率。

c) Slope_{sample} (或Slope_{blank})为每个样品 (或Blank) 采用Kinetic法测定得到的曲线斜率。

* 如果测定样品是由原始样品稀释得来, 则将上述测定值乘以稀释倍数, 以计算原始样品的谷胱甘肽浓度。

10) GSH浓度使用以下公式计算【总谷胱甘肽 (GSH + GSSG) 和GSSG】

$$\text{GSH} = \text{Total Glutathione (GSH + GSSG)} - \text{GSSG} \times 2$$

干扰物

一些还原剂如抗坏血酸, β-巯基乙醇, 二硫苏糖醇 (DTT) 和半胱氨酸, 或巯基反应性化合物如马来酰亚胺化合物会干扰谷胱甘肽测定。因此在样品制备过程中应避免使用这些物质。



网址: <http://www.dojindo.cn> E-mail: info@dojindo.cn

如果您需要更多的信息或者有任何问题可以通过以下的方式联系我们:

东仁化学科技 (上海) 有限公司

上海

上海市零陵路899号飞洲国际广场27楼J座

邮编: 200030

电话: 400-823-9388

北仁化学科技 (北京) 有限公司

北京

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: 100029

电话: 010-8225-1765



2020年1月