



微量还原型谷胱甘肽(GSH)测定试剂盒说明书(精简版)

(货号:A006-2-1 微板法 96T)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 测试后再进行批量实验, 否则由此导致的后果用户自行承担!

一、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 6 个月)

试剂一: 沉淀剂, 20mL×1 瓶, 室温保存。此为过饱和溶液, 如有结晶, 则取上清进行实验。

试剂二: 缓冲液, 20mL×1 瓶, 2~8℃ 保存。

试剂三: 显色剂, 5mL×1 瓶, 2~8℃ 避光保存。

试剂四: 标准品溶剂贮备液, 10mL×1 瓶 (温度较低时可能会有结晶产生, 此时可将试剂 37℃ 融化后使用), 2~8℃ 保存; 临用前将标准品溶剂贮备液: 双蒸水=1:9 稀释成 **GSH 标准品溶剂应用液**。

试剂五: GSH 标准品粉剂, 3.07mg/支×3 支, 2~8℃ 保存。测定前将一支 GSH 标准品用 10mL 标准品溶剂应用液溶解, 配成 **1mmol/LGSH 标准液** (2℃~8℃ 可保存 1~2 周); 再取此 1mmol/LGSH 标准液 0.2mL 加标准品溶剂应用液 9.8mL 配成 **20μmol/LGSH 标准液** (现用现配)。

注: GSH 的分子量为 307。另附送 96 孔板一块。

二、所需仪器耗材及试剂:

含 405~420nm 波长的酶标仪及 96 孔板 (附送一块)、台式低速离心机、各种规格移液器、双蒸水、生理盐水 (0.9%) 或 PBS (0.1M)、涡旋混匀器、离心管、蛋白测定试剂 (组织及细胞样本用, 本公司有售)。

三、测定原理:

还原型谷胱甘肽 (GSH) 可与二硫代二硝基苯甲酸 (DTNB) 反应, 生成一种黄色化合物, 可在 405nm 下进行比色定量测定还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量。

四、检测意义:

还原型谷胱甘肽 (GSH) 是机体内最重要的非酶性抗氧化剂, 具有清除自由基、解毒、促进铁质吸收及维持红细胞膜的完整性、维持脱氧核糖核酸的生物合成、细胞的正常生长发育及细胞免疫等多种重要生理功能。谷胱甘肽是谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸组成的一种三肽, 是组织中主要的非蛋白质的巯基化合物, 并且是 GSH-PX 和 GSH-ST 两种酶类的底物, 为这二种酶分解氢过氧化物所必需, 并能稳定含巯基的酶和防止血红蛋白及其它辅因子受氧化损伤。GSH 是一种低分子清除剂, 可清除 O₂⁻、H₂O₂、LOOH, 因而 GSH 量的多少是衡量机体抗氧化能力的重要因素。

五、样本前处理:

1、培养细胞: 将收集好的细胞, 用 PBS 清洗 1~2 次后, 低速离心收集沉淀细胞, 再加入 0.3~0.5mL (0.1M、PH 7.4) 的等渗 PBS 缓冲液悬浮细胞, 超声或手动研磨破碎细胞 (此处也可将 PBS 替换成试剂一, 细胞破碎后直接离心取上清作显色反应, 但需要将细胞提前计数才行), 取破碎后的细胞悬液 0.1mL, 加 0.1mL 试剂一混匀, 3500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液作显色反应。

2、组织样本:

方法一: 准确称取组织重量 (约 0.05g), 按重量 (g): 体积 (mL) = 1:9 的比例, 加入生理盐水制成组织匀浆, 2500 转/分, 离心 10 分钟, 取匀浆上清 (此匀浆上清需分出一部分用于测定蛋白浓度, 测蛋白的试剂盒本公司有售) 0.1mL, 加 0.1mL 试剂一混匀, 3500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液作显色反应。

方法二: 准确称取组织重量 (约 0.02g), 按重量 (g): 体积 (mL) = 1:9 的比例, 加入试剂一, 机械匀浆, 3500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清作显色反应。()

3、血清 (浆) 样本:

取血清 (浆) 0.05mL, 加试剂一 0.2mL 混匀, 3500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液作显色反应。

4、全血样本:

取 0.1mL 肝素抗凝全血加双蒸水 0.9mL, 充分混匀, 直至透亮为止。取该 10 倍溶血液 0.05mL, 加 0.2mL 试剂一混匀, 3500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液作显色反应。

注: 以上取得的上清假如还是比较浑浊 (或高脂), 可在上清中加入 0.1mL 氯仿, 涡旋混匀, 抽提 60 秒后, 再离心收取上清做显色反应。

六、显色反应:

不同样本用试剂一处理后取得的上清液按下表进行操作:

	空白孔	标准孔	测定孔
试剂一 (μL)	100		
20μmol/LGSH 标准液 (μL)		100	
上清液 (μL)			100
试剂三 (μL)	25	25	25
试剂二 (μL)	100	100	100
轻轻震荡孔板混匀, 静置 5 分钟, 405nm 处, 酶标仪测定各孔吸光度值 A			

七、计算:

1、全血计算公式:

$$\text{全血中GSH含量} (\mu\text{mol/L}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times 5 \times 10$$

C_{标准} 为标准液浓度, 20μmol/L;

5 为样本前处理稀释倍数;

10 为样本测试前稀释倍数。

2、细胞及组织计算公式:

方法一: (此法为生理盐水匀浆后的计算方式)

$$\text{细胞及组织中GSH含量} (\mu\text{mol/g prot}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times 2 \div C_{\text{pr}}$$

C_{标准} 为标准液浓度, 20μmol/L;

2 为样本前处理稀释倍数;

C_{pr} 为样本蛋白浓度, gprot/L (prot 指蛋白)。

方法二: (此法为试剂一作匀浆介质匀浆的计算方式)

$$\text{组织中GSH含量} (\mu\text{mol/g组织}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{样总}} \div W$$

$$\text{细胞中GSH含量} (\mu\text{mol}/10^4 \text{个细胞}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{样总}} \div m$$

C_{标准} 为标准液浓度, 20μmol/L;

V_{样总}: 样本用试剂一匀浆时加入的试剂一的体积, L;

W: 样本质量, g;

m: 细胞数量, 10⁴ 个。

3、血清 (浆) 计算公式:

$$\text{血清 (浆) 中GSH含量} (\mu\text{mol/L}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times 5$$

5 为样本前处理稀释倍数 (1:4);

C_{标准} 为标准液浓度, 20μmol/L。

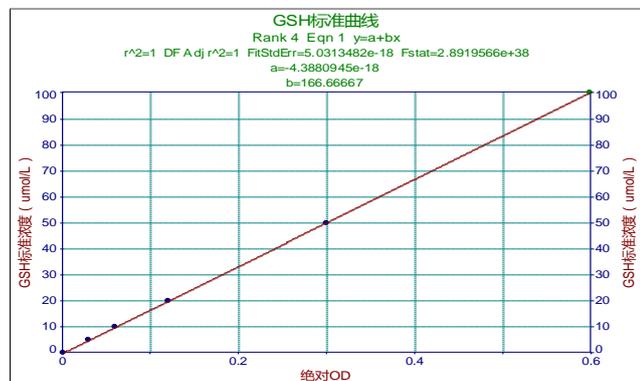
**八、标准曲线：**（试剂盒灵敏度为 1.5 $\mu\text{mol/L}$ ）

取一定量的 1mmol/L GSH 标准液用标准品溶剂应用液配制成不同浓度(0、5、10、20、50、100 $\mu\text{mol/L}$)，按下表进行标准曲线制作：

相当于标准液浓度($\mu\text{mol/L}$)	0	5	10	20	50	100
不同浓度 GSH 标准品 (μL)	100	100	100	100	100	100
试剂三 (μL)	25	25	25	25	25	25
试剂二 (μL)	100	100	100	100	100	100

轻轻震荡孔板混匀，静置 5 分钟，405nm 处，酶标仪测定各孔吸光度值 A

作图如下：



标准曲线可以不做，只需按前面的操作表操作，按计算公式计算即可。

八、技术参数：

- 1、检测范围：0.3-147.1 mgGSH/L。
- 2、批间差 CV：3.86%，批内 CV：1.2%。
- 3、回收率：102%

九、注意事项：

- 1、样本收集好后请尽快检测（最好是立即测定），因样本中相关酶会分解自身的 GSH，导致结果偏低；
- 2、孔板操作时不要加入气泡，以免影响读数；
- 3、标准曲线可不做，按计算公式计算即可；
- 4、细胞样本测定时，尽量多的收集细胞来测定，细胞数越多越好，最低不要低于 10^6 个。