

微量还原型谷胱甘肽(GSH)测定试剂盒

(货号: BC030 微板法 96T)

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: 蒸馏水=1:9 稀释配成**标准品稀释液**。

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 标准品稀释液溶解, 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 加标准品稀释液 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、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。

三、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物, 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 O_2^- 、 H_2O_2 、 $LOOH$, 因而 GSH 量的多少是衡量机体抗氧化能力的重要因素。

四、所需仪器及试剂:

可调 405nm 波长的酶标仪, 离心机, 涡旋混匀器, 蒸馏水, 蛋白测定试剂 (动物组织或细胞用, 本公司有售 BC016)。

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 (0.01M、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) 或细胞培养上清液样本 :

取血清 (浆) 或细胞培养上清 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 肝素抗凝全血加蒸馏水 0.9mL, 充分混匀, 直至透亮为止。取该溶血液 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、细胞及组织计算公式:

①、组织或细胞样本按蛋白浓度计算: (用生理盐水匀浆的样本可按此公式计算)

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

2 为样本前处理稀释倍数;

②、按样本鲜重计算: (用试剂一或生理盐水匀浆的样本均可按此公式计算)

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

③、细胞按细胞数计算:

$$\text{细胞中GSH含量} (\mu\text{mol}/10^6 \text{个细胞}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{样总}} \div m$$

2、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);

3、全血计算公式:

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

5 为样本前处理稀释倍数;

10 为样本测试前稀释倍数。

以上公式中：

$C_{标准}$ 为标准液浓度，20 μ mol/L;

C_{pr} 为样本蛋白浓度，gprot/L (prot 指蛋白)。

$V_{样总}$ ：样本匀浆时加入的匀浆介质的总体积 (如果是用生理盐水匀浆的样本，该体积还需乘以 2 (因其匀浆液需 1:1 加试剂一混匀离心后取上清测定))，L;

W ：样本质量，g;

m ：细胞数量， 10^6 个。

4、计算举例：

例 1：取大鼠肝用生理盐水匀浆，按操作步骤测定，测得测定孔 OD 值为 0.1109，标准孔 OD 值为 0.1502，空白孔 OD 值为 0.0782，10%匀浆液蛋白浓度为 8.866gprot/L；计算为：

$$\begin{aligned} \text{大鼠肝中GSH含量} &= \frac{0.1109 - 0.0782}{0.1502 - 0.0782} \times 20 \times 2 \div 8.866 \\ (\mu\text{mol/gprot}) &= 2.050\mu\text{mol/gprot} \end{aligned}$$

例 2：取大鼠血浆按操作步骤测定，测得测定孔 OD 值为 0.1212，标准孔 OD 值为 0.1502，空白孔 OD 值为 0.0782，计算为：

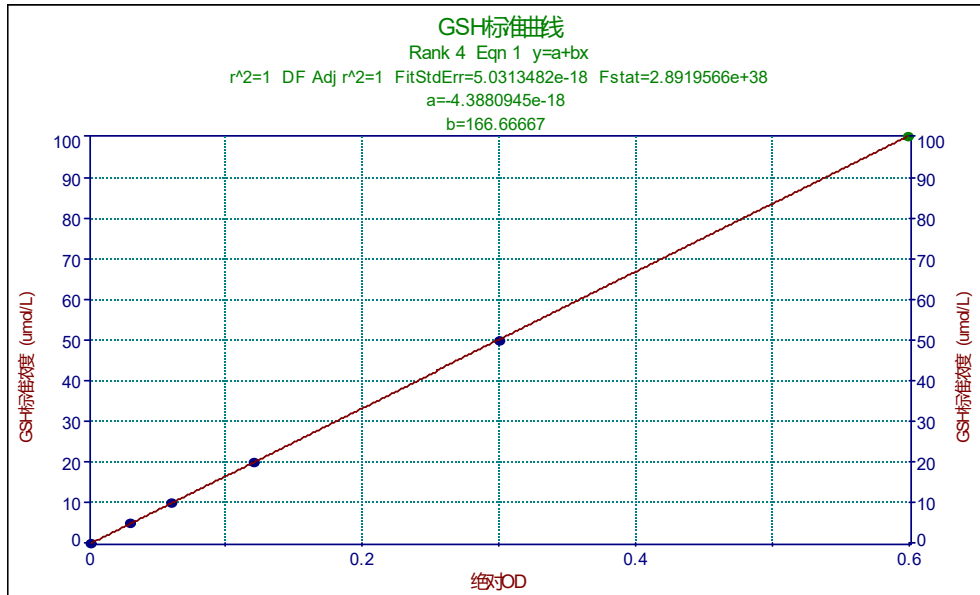
$$\begin{aligned} \text{大鼠血浆GSH} &= \frac{0.1212 - 0.0782}{0.1502 - 0.0782} \times 20 \times 5 \\ \text{含量} (\mu\text{mol/L}) &= 59.72\mu\text{mol/gprot} \end{aligned}$$

八、标准曲线：(试剂盒灵敏度为 1.5 μ mol/L)

取一定量的 1mmol/L GSH 标准液用标准品稀释液配制成不同浓度(0、5、10、20、50、100 μ mol/L)，按下表进行标准曲线制作：

相当于标准液浓度 (μ mol/L)	0	5	10	20	50	100
不同浓度 GSH 标准品 (μ L)	100	100	100	100	100	100
试剂三 (μ L)	25	25	25	25	25	25
试剂二 (μ L)	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：



上述标准曲线可以不做，只需按前面的操作表操作，按计算公式计算即可。

九、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%

十、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。